

Cromo:

un metal pesado que se puede especiar,
entender y del cual se pueden conocer sus
efectos en el ambiente.

Mariela del Milagro Cuéllar

Tesis Doctoral

2018



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Fisicoquímica de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba bajo la dirección de la Dra Patricia Inés Ortiz y se presenta a consideración de dicha facultad para optar el grado de Doctor en Ciencias Químicas, marzo de 2018.

Dra. Patricia I. Ortiz

Directora de Tesis

Comisión evaluadora:

Dra. Magdalena Monferrán

Co-directora de Tesis

Dra. Ana Baruzzi

Miembro de comisión de tesis

Dra. Laura Rossi

Miembro de comisión de tesis

Dra. Alicia Zon

Evaluadora Externa

Prólogo

En esta tesis no se resume todo lo hecho durante mi trabajo doctoral, sino que intento mostrar lo que me ha permitido llegar a conclusiones generales respecto a algunas de las muchas preguntas planteadas.

Lo no escrito también formó parte de mi aprendizaje, formación y madurez. Este crecimiento fue tanto en relación a nuevos conocimientos como en aspectos emocionales.

Las frustraciones y enojos me permitieron conocer el verdadero mundo de la ciencia y de la investigación. Comprendí y aprendí que el método científico no es una serie de pasos lineales y consecutivos, lo que me llevó a construir mi propia definición del trabajo científico.

Para mí, el aporte que cada investigador hace se puede comparar con un árbol ramificado y flexible. El árbol crece mientras, jugando un poco a ser científicos, nos hacemos preguntas e intentamos encontrar respuestas que pueden ser efímeras y en un futuro ser profundizadas o refutadas.

Comprender el trabajo de cada científico como un árbol, me permite comparar a la ciencia con un bosque. Este bosque necesita del trabajo colaborativo, ya que las diferentes miradas permiten una visión más integral sobre un mismo mundo.

A los que no pueden llegar

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a la Pato y a la Gringa por creer en mí, escuchar mis ideas y animarse a combinar sus mundos para buscar respuestas a nuestras inquietudes. De ellas también aprendí a buscar ayuda, a preguntar cuando no se sabe, a escuchar ideas nuevas, entre miles de cosas más.

Quiero agradecerle, también, a mi familia, Walter, Gladis, Noe y Pame, por aceptarme incondicionalmente, aguantar mis cambios de humores repentinos, mis enojos y satisfacciones con mi trabajo. También a las más pequeñas, que ablandan mi corazón con sus charlas y por hacerme sentir un ser importante en sus vidas: Sofi, Bri, Guada y Fran.

A las personas que nombro, influyeron directamente en mi vida científica:

La Vane que me abrió su corazón y dio la mano para atravesar juntas el camino del aprendizaje, desde los comienzos de la facu hasta el fin del doctorado, recorriendo un trayecto pedagógico que nos sirvió para conocernos (aún más) y aceptarnos. No me sueltes la mano amiga, que sin vos me pierdo.

La Noe Batte, que con su paciencia y amor por el conocimiento me apoyó en cada decisión y me empujó a no frenar cuando este cuerpo ya no podía más. ¡Por veinte años más de amistad!

La Peque, quien me asegura que he nacido para esto, aunque reniegue día a día. Con ella aprendí a permitirme sentir las emociones oscuras como la frustración y el enojo.

Vale Pfaffen quien, sin perder toda su paciencia, me ayudó desde preparar un buffer hasta tomar decisiones en mi vida personal.

Lau Valenti que me explicó mucho más de lo que recuerdo, compartiendo música, charlas y ricos mates.

El Ricky que me ayudó a comprender y aceptar el "mundo del paper".

Las más pequeñas del grupo, Fer, Laurita, Dari y Jess, con las que compartimos las mismas inquietudes y anelos, también congresos y hasta el Narco-Hostel.

Al Doc De Pauli y Carla Giacomelli, por sus lindas charlas motivacionales.

Las Ignorantas: Luri y Susi, con quienes nos animamos a adentrarnos en el mundo mágico de la cuántica y con ello a muchas cosas más.

Fer Garay por ayudarme a acomodar mis ideas, compartiéndome su tiempo y sus oídos. Y junto a Vero Baroni me prestaron sus ojos para ver mi mundo desde distintos puntos de vista.

Los chicos y no tan chicos del grupo Baruzi-Yudi, con quienes compartimos tiempo, aprendizajes, mates y experiencias varias.

La Colo y la Ceci, quienes me dieron herramientas y acompañaron emocionalmente.

La Susi Amato que le pone luz y color a nuestro sótano.

También quiero agradecer a quienes me ayudaban a olvidarme de los suburbios del sótano y me llevan al mundo real: las chicas del cole: Emi, Vivi, Campa y Pau y los chicos de escalada: Cutu, Jopi Marian, Gus, Juanjo, Martincho y Tomate.

Por último y no menos importante, le agradezco a Alan por acompañarme, con amor y mucha paciencia, en esta última etapa y darme el mejor regalo de mi vida: Gael.

Resumen

El término metal pesado se utiliza, de manera general, para hacer referencia a los átomos que son tóxicos para la célula, por esta razón se reúnen en este grupo algunos metales ligeros y otros no metales, además de los elementos pesados, por ejemplo: As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Se, entre otros. Los metales desempeñan diferentes roles en la salud humana, algunos son necesarios para funciones metabólicas, con cantidades óptimas para el máximo beneficio y otros son conocidos por causar solo efectos tóxicos en cualquier proporción que sean suministrado. Según estos efectos es que se clasifican en dos grandes grupos: metales esenciales y metales no esenciales.

Debido a situaciones de incompatibilidad química es que no resulta fácil para los organismos mantener el balance óptimo de los metales esenciales. Las situaciones de incompatibilidad pueden ser, entre otras, la solubilidad o los estados redox. Es por esta razón que al hablar de metales pesados se debería especificar el estado del elemento, aclarando si se trata del elemento puro o de algunos o todos los estados de oxidación. Por ese motivo es importante hacer esta especificación o especiación ya que, según el estado, un mismo elemento presenta diferentes propiedades físicas, químicas, tóxicas y ecotóxicas, como así también la movilidad en el ambiente, interacción con compuestos orgánicos, etc. Por ejemplo, existen numerosos informes respecto a la toxicidad de la especie hexavalente de cromo (Cr(VI)), siendo cancerígeno y altamente nocivo mientras que la especie trivalente (Cr(III)) es considerada como un micronutriente.

En este trabajo de tesis doctoral se presenta un estudio de la especiación de dos de las especies más comunes de cromo (Cr(VI), Cr(III)) en diferentes matrices, con un abordaje desde la química analítica y la fisicoquímica del sistema. Como así también la influencia del Cr(VI) en un sistema modelo. En particular se desarrolló una técnica electroanalítica que permite especiar Cr según su estado de oxidación, utilizando el electrodo gotero de mercurio acoplado a un sistema de detección por voltametría de onda cuadrada como instrumento de trabajo. En una segunda instancia se logró establecer el mecanismo de reacción para la

reducción de Cr(III) ligado a DTPA sobre la superficie de mercurio. Y, por último, se evaluó la capacidad de la planta de rúcula de la especie *Eruca sativa* de acumular Cr(VI).

Para el desarrollo de la técnica electroanalítica, fue necesario conocer la influencia de las distintas variables en la respuesta analítica. Durante esta etapa se trabajó con dos diseños experimentales de superficie de respuestas, diseño central compuesto (DCC) para las variables químicas y diseño de Box-Behenken (DBB) para las instrumentales. La optimización de la señal electroquímica de la técnica desarrollada fue obtenida mediante la función deseabilidad.

Utilizando herramientas teóricas-computacionales se logró proponer un mecanismo de reacción, catalítico en dos etapas, una química y otra electroquímica. Durante la primer etapa, luego de formarse el complejo $Cr(III) - DTPA$ y acumularse en las cercanías del electrodo, el ion NO_3^- se acopla al complejo liberando una molécula de agua, formándose así la especie electro-activa. En la segunda etapa, electroquímica, se transfieren los dos electrones involucrados en la reducción de NO_3^- a NO_2^- , éste último se desacopla del complejo, dando lugar al comienzo de un ciclo catalítico en el que $Cr(III) - DTPA$ se comporta como catalizador. Una vez propuesto el mecanismo se pudo conocer la dependencia general de la corriente en función de las variables instrumentales como la frecuencia y amplitud, para dicho mecanismo.

Para estudiar la capacidad de acumular Cr(VI) tanto de plantas como del suelo, en el que estas se desarrollaron, se utilizó la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Por otra parte, se determinó en las plantas de rúcula expuestas a diferentes concentraciones de Cr(VI), el contenido de polifenoles totales (PT) y el perfil de polifenoles. Los PT se midieron espectrofotométricamente utilizando para la extracción y determinación de los mismos técnica de Folin-Ciocalteu. Mientras que el perfil de polifenoles fue determinado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con detección mediante arreglo de diodos y acoplada a un espectrómetro de masa (HPLC-DAD-ESI-QTOF).

Por último, con los estudios realizados, se logró determinar la correlación entre la capacidad antioxidantes y el contenido de polifenoles totales en planta de rúcula de la especie *Eruca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Cr(VI).

En conclusión, a partir de un abordaje multidisciplinario, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron tener un mayor conocimiento del sistema tanto desde la química analítica, la fisicoquímica como de la química ambiental.

Abstract

The general concept of "heavy metal" makes reference to elements that are toxic for the cells. For this reason, certain light metals and non-metals are grouped under this category, together with heavy metals, for instance, As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Se, among others. Metals have different roles in human health; some participate in the metabolic process showing a benefit at a certain concentration and others are known for provoking toxic effects independently of the concentration. According to these effects, metals are also classified into two big groups: essential and non-essential metals.

Due to chemical incompatibility sometimes it is not easy for organisms to keep the right balance of essential metals. The causes of incompatibility may be, for instance, solubility or redox potential, among others. It is important to mention the oxidation state of the element when referring to heavy metals, specifying if it is a pure element or if it belongs to any oxidation state. For this reason, it is important to be clear and specific enough with the state; the same element presents different physical, chemical, toxic and ecotoxic properties, as well as the mobility within the environment, the interaction with organic compounds, among others. For instance, there are many reports about the toxicity of hexavalent chromium compounds (Cr(VI)) being a carcinogenic substance and highly damaging whereas the trivalent element (Cr(III)) is considered a micronutrient.

In this PhD project the quantification and speciation of the two most common species of chromium (Cr(VI) y Cr(III)) in different matrix is presented in a combined perspective from analytical chemistry and a physico-chemical approach. Cr(VI) influences in a model system is also analyzed. Particularly, an electroanalytical method was developed that allows chromium speciation using a hanging drop mercury electrode coupled to square wave voltammetric detector. It was also possible to establish the reaction mechanism for Cr(III) reduction in the presence of DTPA. Finally, the ability of the plant arugula from *Eruca sativa* to accumulate Cr(VI) was also evaluated.

In order to develop the electroanalytical technique, the influence of different variables in the analytic response must be considered. Response surface methodology (RSM) was used to optimize voltammetric signal of hanging mercury drop electrode (HMDE) for inorganic chromium determination and speciation. Initial solution pH, DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid) concentration, SWV frequency, pulse height, step potential, accumulation time and accumulation potential were considered as important operating factors through experimental design methodology for Cr(VI) quantification. The central composite and a Box–Behnken designs as response surface design coupled with numerical optimization technique was applied for obtaining the optimum chemical and SWV instrumental conditions as well as the maximum height of chromium reduction peak. Using the proposed method, inorganic chromium speciation was successfully determined in water samples with standard addition method, suggesting that the method can be applied to the quantification of inorganic chromium speciation in water samples.

The electrocatalytic mechanism of Cr(III) reduction in the presence of DTPA and nitrate ions was studied theoretically, using computational tools, and experimentally by using stripping square-wave voltammetry (SWV). These studies allowed proposing a catalytic mechanism in two steps, one chemical and the other electrochemical. Initially, after the *Cr(III) – DTPA* complex is formed and it accumulates on the neighbors of the electrode interface the NO_3^- couples the complex that releases a water molecule, and the electroactive molecule is formed. Then, during the electrochemical step two electrons are transferred related to NO_3^- to NO_2^- reduction, this ion releases the complex and the catalytic cycle starts, where the *Cr(III) – DTPA* complex is the catalyst. Using the proposed mechanism, the general dependence of the reduction current with the instrumental variables, such as frequency and amplitude could be described.

The capacity of Cr(VI) accumulation both in plants and soil, where they were grown, was studied by inductively coupled plasma source coupled to mass spectrometry (ICP-MS). Moreover, total polyphenols (TP) were spectrophotometrically measured before an extraction step using the Folin-Ciocalteu technique. By the other side, TP profiles were

obtained by HPLC with diode array detection and coupled to a mass spectrometer (HPLC-DAD-ESI-QTOF).

Finally, with the analysis carried out it was possible to establish a correlation between the antioxidant capacity and TP content in the arugula plant of *Eruca sativa* species exposed to different Cr(VI) concentrations.

In conclusion, from a multidisciplinary approach, the obtained results allowed to get a better knowledge of the system not only from the analytical chemistry view but also from a physicochemical and environmental chemistry perspective.

Índice

Introducción General	1
Metales pesados	3
Especiación de metales	5
Cromo: un elemento, distintos comportamientos	7
Transferencia del Cromo desde el suelo hacia la planta	11
Técnicas de especiación de Cromo	12
Objetivo general	15
Bibliografía	16
Aplicación del diseño experimental multifactorial para modelar y optimizar la especiación de cromo inorgánico mediante voltametría de onda cuadrada	21
Pregunta disparadora	23
Objetivos	23
Importancia del diseño de experimentos como herramienta experimental	23
Materiales y métodos	26
Reactivos químicos y soluciones	26
Fundamentos de la técnica de voltamperometría de onda cuadrada	27
Equipamiento	29
Fundamentos del diseño estadístico de experimentos	30
Metodología de superficie de respuesta	34
Diseño central compuesto	36
Diseño de Box-Behnken	37
Optimización simultánea y función deseabilidad	38
Programa para diseño estadístico de experimentos	39
Parte experimental	40
Método analítico sin agente oxidante: Método 1	40
Método analítico con agente oxidante: Método 2	43
Resultados y discusión	44
Método analítico sin agente oxidante: Método 1	44

Método analítico con agente oxidante: Método 2	46
Diseño factorial de experimentos	48
Planificación: conocimiento preliminar del sistema en estudio	48
Diseño de experimentos	53
Análisis estadístico	57
Optimización de variables químicas	57
Optimización de las variables instrumentales	62
Cuantificación y especiación en muestras reales y artificiales	68
Conclusiones	72
Bibliografía	74

Estudio teórico y experimental de voltametría de redisolución catódica de especies de cromo inorgánico	77
Pregunta disparadora	79
Objetivos	79
Importancia de los estudios teóricos-experimentales	79
Redisolución catódica catalítica: cuantificación de Cr en solución	80
Materiales y métodos	85
Reactivos químicos y soluciones	85
Equipamiento	85
Programa de simulación	86
Resultados y discusión	86
Mecanismo de reacción: catalítico tipo 1	86
Comparación entre el comportamiento experimental y el estudio teórico	88
Mecanismo de reacción: catalítico tipo 2 sin adsorción	91
Modelo Matemático	95
Comparación entre el comportamiento experimental y el estudio teórico	98
Estudio sobre la dependencia de la corriente respecto la frecuencia	100
Estudio sobre la dependencia de la corriente respecto de la amplitud	100
Mecanismo de reacción: catalítico tipo 2 con adsorción	106
Modelo Matemático	109

Comparación entre el comportamiento experimental y el estudio teórico	114
Estudio sobre la dependencia de la corriente respecto la frecuencia	116
Estudio sobre la dependencia de la corriente respecto de la amplitud	119
Conclusiones	124
Apéndice	126
Bibliografía	128
 Estudio del efecto del Cr(VI) en plantas de Rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i>	 133
Pregunta disparadora	135
Objetivos	135
Sistema de defensa de plantas frente a la exposición de metales pesados	135
Plantas de rúcula: fuentes ricas en polifenoles	139
Materiales y métodos	140
Reactivos químicos y soluciones	140
Fundamentos de la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)	141
Equipamiento	143
Fundamentos de la cromatografía líquida HPLC-DAD-ESI-QTOF	143
Equipamiento	144
Parte experimental	146
Extracción de la fracción biodisponible de metales en muestras de suelo	146
Extracción de metales en muestras de plantas de rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i>	146
Extracción de compuestos polifenólicos en muestras de plantas de rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i>	147
Exposición de las plantas de rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i> a diferentes concentraciones de Cr(VI)	147
Determinación de compuestos polifenólicos totales en plantas de rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i> : técnica de Folin-Ciocalteu	148

Determinación del Perfil de polifenoles en plantas de rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i>	149
Determinación de la capacidad antioxidante in vitro en plantas de rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i>	150
Ensayo FRAP	150
Ensayo ABTS	151
Ensayo DPPH	153
Resultados y discusión	154
Estudios del efecto del Cr(VI) respecto a la acumulación en suelo y bioacumulación en plantas de rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i>	154
Estudio del potencial efecto toxico del Cr respecto al consumo humano	168
Estudio del estrés oxidativo y de la capacidad antioxidante frente a la exposición de plantas de rúcula de la especie <i>Eruca sativa</i> a Cr(VI)	170
Determinación de Compuestos Polifenólicos Totales	170
Determinación del Perfil de polifenoles: Identificación de compuestos	173
Cuantificación de los compuestos polifenólicos	177
Determinación de la Capacidad Antioxidante in vitro	184
Conclusiones	191
Bibliografía	194
Conclusiones generales y Perspectivas futuras	201
Conclusiones generales	203
Perspectivas futuras	205
Anexo	207

Introducción general

Cromo: un metal pesado que se puede especiar,
entender y del cual se pueden conocer sus
efectos en el ambiente



Metales pesados

El término “metales pesados” se utiliza para elementos químicos que, en estado puro, tienen número atómico mayor a 20, exceptuando los metales alcalinos o alcalinos térreos [1]. Otro criterio para englobar los elementos químicos en este grupo es la densidad atómica, se considera como metales pesados a los que presentan valores de densidad mayor a 6 g cm^{-3} [2].

De manera general se utiliza el término metal pesado para hacer referencia a los átomos que son tóxicos para la célula, por esta razón se agrupan, además de los elementos pesados, algunos metales ligeros y otros no metales. Debido a esto, elementos como As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Se, entre otros, son englobados en este grupo [1].

Los metales pesados se encuentran en la corteza terrestre, presentes en rocas, suelos, sedimentos, también en ecosistemas de agua dulce y agua marina. La presencia de estos metales en la corteza terrestre es, generalmente, menor a 0,01%. El aumento de los niveles de éstos en el ambiente, se debe a diferentes actividades antropogénicas como minería y fundición, el uso de pesticidas y fertilizantes con fosfatos, producción de energía a partir del carbón, desechos contaminados con metales y residuos industriales como galvanoplastia, aleación, producción de baterías, pigmentos y plásticos [3,4]. La contaminación con metales en suelo y agua es un grave problema para el ambiente y se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial [5,6].

Los metales desempeñan diferentes roles en la salud humana. Algunos metales son necesarios para la función metabólica normal, con cantidades óptimas para el máximo beneficio. Otros son conocidos por causar solo efectos tóxicos en cualquier

proporción que sean suministrados [7]. Según estas consideraciones es que se clasifican en dos grandes grupos: metales esenciales y metales no esenciales [1].

Los metales o elementos esenciales, también conocidos como oligoelementos o micronutrientes, son necesarios en ciertas concentraciones para un buen desarrollo de la salud humana, tornándose tóxicos por encima de ciertos niveles. Dentro de este grupo se pueden mencionar: As, B, Cr, Cu, Co, Fe, Mo, Ni, Se y Zn. El segundo grupo de metales no esenciales corresponde a los metales que no tienen funciones biológicas conocidas, éstos son altamente tóxicos en todas las concentraciones, algunos son: Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi [1].

En la Figura 1 se muestran las curvas del efecto fisiológico respecto a la dosis del elemento, tanto para los metales esenciales como para elementos no esenciales.

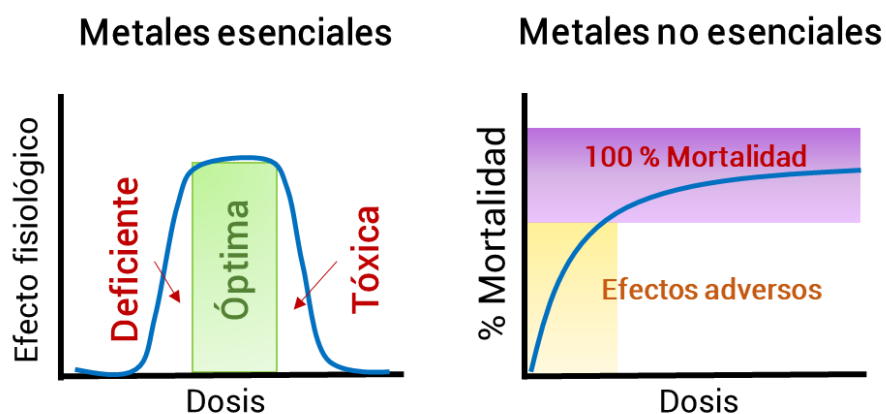


Figura 1: Esquema del efecto fisiológico en función a la dosis del elemento. figura tomada del libro: "Química bioinorgánica", Enrique J. Baran, 1994.

Es posible identificar en el esquema de metales esenciales, de la Figura 1, una zona de meseta, ésta corresponde al intervalo óptimo de concentración de elemento esencial. Los valores por debajo o encima de esa región óptima corresponden a dosis que afectan la salud humana, tanto por déficit o por intoxicación,

respectivamente. Si se llega a situaciones extremas tanto por adsorción deficitaria o por incorporación en exceso pueden llevar a la muerte [8].

Por otra parte, el esquema de metales no esenciales muestra el porcentaje de mortalidad, como efecto fisiológico, respecto de la dosis de estos metales. Es importante destacar de dicha figura que el efecto fisiológico es siempre pernicioso hasta llegar rápidamente a la dosis que produce un 100% de mortalidad.

El balance óptimo de los metales esenciales se logra cuando un organismo dado puede mantener todos estos elementos en la zona de meseta. Sostener este balance no es fácil para los seres vivos, ya que existen situaciones de incompatibilidad química, como la solubilidad o los estados redox [8]. Debido a esto, cuando se habla de metales pesados debería especificarse el estado del elemento, por ejemplo, el de oxidación, aclarando si se trata del elemento puro o de algunos o todos los estados de oxidación. Es importante hacer esta especiación o especificación ya que, según el estado, un mismo elemento presenta diferentes propiedades físicas, químicas, tóxicas y ecotóxicas, como así también la movilidad en el ambiente, interacción con compuestos orgánicos, etc. [1,9]. Por ejemplo, existen numerosos informes respecto a la toxicidad de la especie hexavalente de Cr (Cr (VI)), siendo cancerígeno y altamente nocivo mientras que la especie trivalente (Cr(III)) es considerada como un micronutriente para el reino animal [4,10,11].

Especiación de metales

La especiación hace referencia a aspectos químicos y físicos de un elemento. La identidad del elemento, el estado de oxidación, la estequiometría, los complejos que se forman entre sólidos y las especies disueltas, o la geometría molecular y el entorno de coordinación del metal (incluido el número y tipo de ligandos),

contribuyen a una especiación definida [7,12,13]. Estas propiedades controlan el comportamiento químico de los elementos, tanto en el ambiente como en organismos vivos, y desempeñan un papel crucial en la determinación de la toxicidad.

Al tener consideraciones químicas, físicas y también biológicas, la especiación es considerada como un término multifacético y precisa de un esfuerzo multidisciplinario, por lo que se torna difícil asignar una sola definición [12].

Al hablar de especiación de metales pesados se pretende destacar la toxicidad y el riesgo potencial para los organismos expuestos a los distintos estados de oxidación de estos contaminantes.

Cuando el suelo es el medio que está expuesto a los metales pesados es necesario vincular la especiación con la biodisponibilidad, ya que un elemento es biodisponible si se encuentra en una forma química tal que puedan ser fácilmente absorbidas por las plantas. La especiación es fundamental para comprender la toxicidad química, la biodisponibilidad, el transporte y el destino del metal en el ambiente [13].

Debido a que cada especie de un elemento químico tiene diferente comportamiento, movilidad y transporte, en un sistema dado [1,14], es que resulta de fundamental importancia lograr la especiación de los metales pesados y con esto desarrollar técnicas para determinar los distintos aspectos que definen a dichas especies [7].

Cromo: un elemento, distintos comportamientos

El Cr tiene número atómico 24, peso atómico 51,1 u.m.a. y densidad $7,19 \text{ g cm}^{-3}$, es un metal duro de color plateado. Corresponde al 7º elemento más abundante y es el número 21 respecto a la abundancia de metales de la corteza terrestre [15,16].

El Cr tiene numerosos estados de oxidación, desde -2 hasta +6, pero el ion cromato hexavalente (Cr(VI)) y el cromito trivalente (Cr(III)) son los más comunes y estables en la naturaleza [2,6,12].

En ciertos minerales, en la mayoría de los suelos y en el agua, el Cr se coordina de manera dominante con el oxígeno. El Cr(III) tiene preferencia por la coordinación octaédrica, éste se hidroliza y dependiendo del pH puede formar alguno de los siguientes hidróxidos: $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$ y $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$. Por otra parte, esta especie trivalente puede formar complejos acuosos con ligandos orgánicos e inorgánicos.

El Cr(VI) se produce casi exclusivamente en coordinación tetraédrica con oxígeno, como el anión cromato (CrO_4^{2-}), esta especie totalmente deprotonada existe mayoritariamente a valores de pH mayores a 8,5. Por otra parte, el ácido crómico (H_2CrO_4) pierde fácilmente el primer protón, comportándose como un ácido fuerte, por lo que a pH menores a 6,5 (valor del pK_{a2}) predomina la especie monoprotonada (HCrO_4^-). Dependiendo de la concentración, esta especie monoprotonada tiende a dimerizar formando el ion dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) luego de perder una molécula de agua. La formación de este dímero deja de ser despreciable a partir de concentraciones mayores a 0,5 M, por ejemplo, para una concentración de 0,5 mM la relación de porcentaje de $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ frente a HCrO_4^- es alrededor de 2:98 caso contrario, para una concentración de 1M la relación se invierte a 89:11 [7,20].

El Cr es uno de los 18 contaminantes peligrosos del aire y ha sido clasificado en el 7° lugar entre las 20 principales sustancias peligrosas por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los EEUU [17]. Este metal ocupa el quinto lugar entre los metales pesados en la Ley de Respuesta Ambiental Integral, Compensación y Responsabilidad de EEUU [18]. También se clasifica como carcinógeno tipo I de acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Debido a todos estos motivos es que este metal requiere una comprensión detallada y un monitoreo profundo en el ambiente, especialmente en el sistema suelo-planta [16].

La Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA), regula por separado a las diferentes especies de Cr (Cr(VI) y Cr(III)) debido a que presentan diferencias en cuanto a sus características químicas, epidemiológicas y tóxicas. También difieren en gran medida respecto a la sorción y biodisponibilidad en el suelo, absorción y translocación a partes aéreas y toxicidad dentro de la planta [11,21].

El estado de oxidación predominante de Cr, en condiciones de exceso de oxígeno, es el hexavalente y en condiciones anóxicas prevalece la especie trivalente [22]. En general, la especie de Cr(VI) es considerada más tóxica que la de Cr(III). El ion trivalente es necesario para el metabolismo lipídico y de azúcares [4], la deficiencia del mismo puede provocar obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares [7]. Esta especie de Cr es considerado como oligoelemento tanto para animales, como para humanos, pero no se conocen funciones biológicas del mismo en plantas [11,16,23].

El efecto tóxico de la especie hexavalente para sistemas biológicos es atribuido a la habilidad de migrar a través de membranas celulares, aumentando la concentración de Cr en el interior de la célula [4].

Debido a que los oxoaniones de Cr(VI) , tanto CrO_4^{2-} como $Cr_2O_7^{2-}$, no son fuertemente adsorbidos en ciertos tipos de suelos, es que presentan una gran movilidad en ambientes subterráneos. A causa de esta movilidad es que éstos se encuentran biodisponibles y, por esta razón, ejercen sus efectos tóxicos en sistemas biológicos. Por otra parte, los cationes que forma el Cr(III) presentan una baja movilidad debido a que poseen reacciones complicadas en ambientes naturales, además de tener cinéticas de reacción muy lentas [14,24].

Las fuentes de Cr en el ambiente son tanto naturales como antropogénicas. El Cr, en la naturaleza, se presenta como cromita ($FeCr_2O_4$) en rocas serpentinas o ultramáficas o como un constituyente de vauquelinita ($CuPb_2CrO_4 - PO_4OH$), tarapacaíta (K_2CrO_4), bentorita ($Ca_6(CrAl)_2(SO_4)_3$) y crocoíta ($PbCrO_4$). El Cr puede persistir en minerales originales, coprecipitado con óxidos e hidróxidos de manganeso, aluminio y/o hierro, que generalmente se adsorben en las partículas del suelo y se complejan con compuestos orgánicos del suelo [16]. Los niveles de Cr para la mayoría de los suelos varían entre 15 y $100 \mu g g_{suelo}^{-1}$, al aumentar el contenido de arcillas aumenta este valor [16,23]. En agua dulce, los valores de Cr varían entre $0,1$ y $117 mg L^{-1}$, mientras que en el agua de mar el intervalo es entre $0,2 - 50 mg L^{-1}$. Los niveles de Cr en aire en zonas urbanas están entre 15×10^{-3} y $30 \times 10^{-3} \mu g m^{-3}$ y en zonas alejadas de grandes ciudades ronda entre $0,059 \times 10^{-3}$ y $1,29 \times 10^{-3} \mu g m^{-3}$ [15].

Las fuentes antropogénicas del Cr están relacionadas con numerosas actividades industriales y agrícolas. Las industrias que más lo utilizan son las metalúrgicas, las de galvanoplastia, producción de pinturas y pigmentos, curtiembres, conservación de maderas, producción de pulpa y papel. Otras fuentes principales de Cr son los fertilizantes y las aguas residuales [10,18]. La minería de Cr se ha incrementado

significativamente a nivel mundial, esta producción minera en el año 2000 fue de $1,37 \times 10^6$ toneladas métricas, pero continuó en aumento y en 2015 pasó a ser de 27×10^6 toneladas métricas [25].

La Figura 2 muestra la producción de Cr a lo largo de los años, desde 2001 a 2015. Es importante destacar en la figura que el aumento en la producción fue de más del doble en menos de 15 años [16,25].

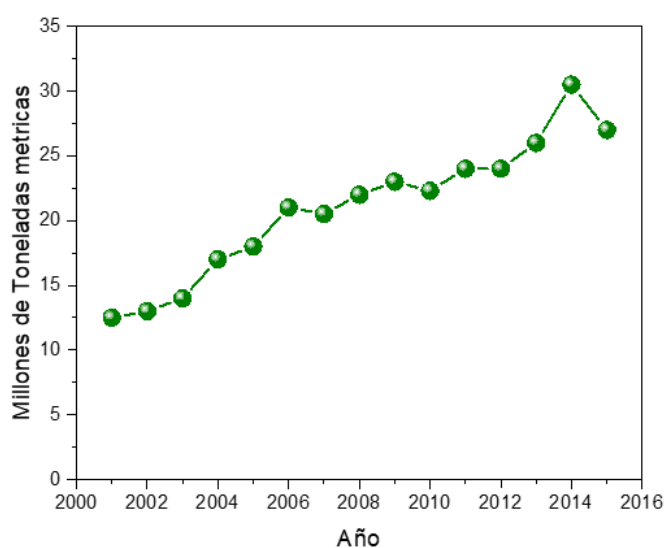


Figura 2: Producción media de Cr a nivel mundial en mil toneladas métricas, a lo largo de los años (2001 a 2015) [16,25]. Figura tomada de "Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plants system: A review". M. Shahis et al. *Chemosphere*. 2017;178:513-533.

Las emisiones de Cr desde torres de enfriamiento industriales es una de las fuentes antropogénicas más importantes de este metal. También vía deposición atmosférica se aportan cantidades significativas de Cr a los suelos y sedimentos indirectamente. Otra fuente importante de dicho metal al ambiente es a partir del vertido de desechos sólidos y líquidos que lo contienen [16]. Las fuentes naturales y geológicas, como polvo de las rocas y la actividad volcánica, proveen Cr tanto al aire,

como al suelo y agua. Se estima que las fuentes naturales emiten alrededor de 43×10^3 toneladas anuales de Cr a nivel mundial [15].

Transferencia de Cr desde el suelo hacia la planta

Las plantas pueden ser clasificadas en tres grandes grupos según su capacidad de acumular contaminante: Excluidoras (mantienen la concentración del metal expuesto a bajos niveles en sus células), Acumuladoras (concentran metales en hojas y tallos) e Indicadoras (la concentración de metal que logran acumular a nivel celular refleja la concentración externa) [26]. Debido a esto es que se considera que la transferencia suelo-planta de los metales en general y del Cr, en particular, está controlada por numerosos factores relacionados con la fisiología de la planta, por ejemplo, el tipo de planta, velocidad y tipo de secreciones radiculares, área de la superficie de la raíz y transpiración. También depende de las propiedades del suelo tales como: textura, pH y capacidad de intercambio de cationes [16,26]. En la mayoría de las especies de plantas, el Cr se acumula principalmente en las raíces y transloca pobremente hacia las hojas [3,23].

El rol biológico del Cr en plantas es desconocido, tanto para el metabolismo fisiológico como el bioquímico. Los niveles altos del metal en tejidos vegetales pueden provocar efectos tóxicos tanto a nivel fisiológico, morfológico y bioquímico [3,23]. La toxicidad de éste se atribuye a la acción en procesos genéticos, vías metabólicas e interacción con macromoléculas celulares [3,16,26].

El efecto tóxico del Cr detiene el crecimiento de plantas, genera modificaciones ultraestructurales en membranas celulares y cloroplastos, induce la clorosis de las hojas, daña las células de la raíz, reduce el contenido de pigmentos, altera tanto las relaciones hídricas como la nutrición y las actividades enzimáticas [10,11,16,26].

La acumulación de Cr en plantas genera especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel celular. Al estar presentes en valores elevados, las ROS, pueden provocar la muerte celular debido a procesos oxidativos como la mutilación de ADN y ARN, la inhibición de enzimas, la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas, suprime el funcionamiento y la regulación de varias proteínas y causa aberraciones cromosómicas en los tejidos de las plantas [3,16].

Las plantas han desarrollado numerosas estrategias de defensa frente a la exposición a Cr. Como mecanismos donde se producen enzimas antioxidantes que reaccionan frente al exceso de ROS y otras enzimas resistentes al metal. Otro mecanismo de defensa es el de quelar al Cr mediante moléculas orgánicas seguido por el secuestro del complejo dentro de vacuolas y la exudación [3,16].

Técnicas de especiación de cromo

El análisis de especiación en muestras de agua requiere de una técnica capaz de distinguir entre diferentes formas químicas con suficiente exactitud, precisión y sensibilidad, y sin alteración ni contaminación de la especie durante el manejo y análisis de la muestra [20].

En general se utilizan métodos no específicos para la especiación de Cr. Éstos requieren, en una primera instancia, la separación preliminar específica de las distintas especies de Cr o la eliminación selectiva de una especie de la muestra. Posteriormente, se realiza la medición no específica de la formas separada por medio de espectroscopía de absorción atómica (AAS), espectroscopia de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) o

espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) [27].

Otro método que se usa para la cuantificación de Cr(VI) en muestras de agua es la colorimetría, aunque muchas sustancias orgánicas que coexistente en la muestra naturales actúan como interferentes [14].

Muchos de los estudios analíticos utilizados para la cuantificación de Cr emplean como estrategia, previo al análisis, la formación de complejos del metal. De esta manera se puede detectar concentraciones micromolares o nanomolares. Por ejemplo los métodos espectrofotométricos utilizan agentes complejantes como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), difenilcarbazida o dimetilglioxima, entre otros, logrando aumentar la sensibilidad y el límite de detección [24].

Los métodos específicos que se utilizan para la determinación de Cr, en general, son electroquímicos y, además de la respuesta específica, presentan alta sensibilidad.

Existen estudios en que se ha determinado Cr(VI) mediante polarografía de pulso diferencial a pH 10 y pH 12, con unos $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de límite de detección [28]. También se han desarrollado técnicas para la determinación de Cr^{6+} utilizando, por ejemplo, amperometría con electrodos rotantes de oro amalgamados (para evitar la pasivación de la superficie) obteniendo límites de detección de 1 nmol L^{-1} [29].

En 1958 Louis Meites desarrolló una técnica coulombimétrica con potenciales controlados utilizando electrodo de mercurio como superficie de trabajo, en la cual se reduce cuantitativamente todo el Cr presente en la solución a Cr(II), determinando luego el Cr(III) a través de la cantidad de electricidad consumida en esta reoxidación [30].

Si bien estas técnicas electroquímicas reportadas no logran la especiación y determinan una sola especie, resultan de gran interés por lograr la cuantificación con límites muy bajos.

Algunos tipos de electrodos utilizados para la detección y especiación de Cr, son los de película de bismuto depositado sobre carbono vítreo con disco rotante, electrodos de grafito impresos sobre placas de oro o sobre películas de poli-L-histidina, también se ha trabajado con electrodos de carbono vítreo modificados con nanopartículas de oro y plata [20].

Por otra parte, se ha intentado determinar Cr utilizando como electrodo de trabajo el de carbono vítreo utilizando amoníaco como solución reguladora de pH o en solución de HCl. El fracaso de estos métodos ha sido el no conseguir reproducibilidad en la detección [31].

Las técnicas electroquímicas más utilizadas para la especiación de este metal es la voltamperometría de redisolución catódica de barrido catalítico (CCSV). A partir de la cual, se logra un límite de detección del orden de nanogramos por litro ($ng\ L^{-1}$) para la determinación de Cr(VI) en algunas muestras de aguas naturales. Esta técnica de especiación utiliza como electrodo de trabajo electrodos de mercurio, como por ejemplo el de gota colgante de mercurio o los electrodos de película de mercurio [4,14,20]. Esta estrategia electroquímica requiere la presencia de iones nitrato y la formación de un complejo entre Cr(III) y algún ligando. Por ejemplo se han usado el ácido trietilentetraaminoexaacético (TTHA), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), o el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), con límites de detección de 300, 200 y 20 $ng\ L^{-1}$ respectivamente [31,32]. La señal electroquímica empleada en esta técnica corresponde a la reducción del átomo central del complejo formado con el ligando: Cr(III)-Ligando a Cr(II)-Ligando,

mientras que los iones nitratos actuarían como catalizador regenerando la especie oxidada Cr(III)-Ligando. Esta estrategia permite especiar al Cr ya que se logra cuantificar tanto Cr total como Cr(VI) y por diferencia se obtiene la concentración de Cr(III) [14].

Objetivo general

Evaluar la incidencia de Cr sobre el crecimiento de plantas de rúcula mediante diferentes técnicas analíticas.

Bibliografía

- [1] J.P. Navarro-Aviñó, I. Aguilar Alonso, J.R. López-Moya, Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas, *Ecosistemas*. 16 (2007) 10–25.
- [2] M. Rafati, N. Khorasani, F. Moattar, A. Shirvany, F. Moraghebi, S. Hosseinzadeh, Phytoremediation potential of populus alba and morus alba for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil, *Int. J. Environ. Res.* 5 (2011) 961–970.
- [3] I. Stolfi, T. Pfeiffer, D. Spoljaric, T. Teklic, Z. Loncaric, Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Plants: Response of the Antioxidative System, Osijek, Croatia, 2015.
- [4] A. Bobrowski, A. Królicka, J. Zarębski, Characteristics of voltammetric determination and speciation of chromium - A Review, *Electroanalysis*. 21 (2009) 1449–1458.
- [5] F. Zojaji, A.H. Hassani, M.H. Sayadi, Bioaccumulation of chromium by Zea mays in wastewater-irrigated soil : An experimental study, *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* 4 (2014) 62–67.
- [6] C. Su, L. Jiang, W. Zhang, A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques, *Environ. Skept. Critics*. 3 (2014) 24–38.
- [7] R.J. Reeder, M.A.A. Schoonen, A. Lanzirrotti, Metal Speciation and Its Role in Bioaccessibility and Bioavailability, *Rev. Mineral. Geochemistry*. 64 (2006) 59–113.

- [8] E.J. Baran, Química Bioinorgánica, Primera, Madrid, 1994.
- [9] M. Shahid, E. Pinelli, B. Pourrut, J. Silvestre, C. Dumat, Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 78–84.
- [10] H. Amin, B.A. Arain, F. Amin, M.A. Surhio, Phytotoxicity of Chromium on Germination , Growth and Biochemical Attributes of *Hibiscus esculentus* L., *Am. J. Plant Sci.* 4 (2013) 2431–2439.
- [11] S. Volland, C. Lütz, B. Michalke, U. Lütz-Meindl, Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*, *Aquat. Toxicol.* 109 (2012) 59–69.
- [12] J. VanBriesen, M. Small, Modelling Chemical Speciation: Thermodynamics, Kinetics and Uncertainty, in: G. Hanrahan (Ed.), *Model. Pollut. Complex Environ. Syst. Vol. II*, 2010: pp. 133–149.
- [13] D. Roberts, M. Nachtegaal, D. Sparks, Speciation of Metals in Soils, in: *Chem. Process. Soils*, 8th ed., Madison, USA, 2005: pp. 619–656.
- [14] Y. Li, H. Xue, Determination of Cr(III) and Cr(VI) species in natural waters by catalytic cathodic stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta.* 448 (2001) 121–134.
- [15] J.O. Nriagu, E. Nieboer, *Chromium in the Natural and Human Environments*, New York, 1988.
- [16] M. Shahid, S. Shamshad, M. Rafiq, S. Khalid, I. Bibi, N.K. Niazi, C. Dumat, M.I. Rashid, Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review, *Chemosphere.* 178 (2017) 513–

533.

- [17] Y.J. Oh, H. Song, W.S. Shin, S.J. Choi, Y.H. Kim, Effect of amorphous silica and silica sand on removal of chromium(VI) by zero-valent iron, *Chemosphere*. 66 (2007) 858–865.
- [18] H. Ma, M. Hung, P. Chen, A systemic health risk assessment for the chromium cycle in Taiwan, *Environ. Int.* 33 (2007) 206–218.
- [19] M. Chebeir, G. Chen, H. Liu, Emerging investigators series: frontier review: occurrence and speciation of chromium in drinking water distribution systems, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2 (2016) 906–914.
- [20] R.T. Kachoosangi, R.G. Compton, Voltammetric determination of Chromium(VI) using a gold film modified carbon composite electrode, *Sensors Actuators, B Chem.* 178 (2013) 555–562.
- [21] G. Choppala, A. Kunhikrishnan, B. Seshadri, J.H. Park, R. Bush, N. Bolan, Comparative sorption of chromium species as influenced by pH, surface charge and organic matter content in contaminated soils, *J. Geochemical Explor.* (2016) 6–11.
- [22] M. Boussemart, C.M.G. van den Berg, M. Ghaddaf, The determination of the chromium speciation in sea water using catalytic cathodic stripping voltametry, *Anal. Chim. Acta.* 262 (1992) 103–115.
- [23] I.E. Akinci, S. Akinci, Effect of chromium toxicity on germination and early seedling growth in melon (*Cucumis melo* L.), *African J. Biotechnol.* 9 (2010) 4589–4594.
- [24] R. Montauban-González, Determinación de Cr(III) y Cr (VI) mediante

- tecnicas electroquímicas de análisis, Tesis. (2013) 1–118.
- [25] USGS, Mineral Commodities Summaries, Virginia, 2015.
- [26] C. Santos, E. Rodriguez, Review on Some Emerging Endpoints of Chromium (VI) and Lead Phytotoxicity, Intech Open Access Publ. (2012).
- [27] A. Bobrowski, B. Baś, J. Dominik, E. Niewiara, E. Szalińska, D. Vignati, J. Zarębski, Chromium speciation study in polluted waters using catalytic adsorptive stripping voltammetry and tangential flow filtration, *Talanta*. 63 (2004) 1003–1012.
- [28] C. Harzdorf, G. Janser, The determination of Chromium (VI) in wastewater and industrial effluents by Differential Pulse Polarography, *Anal. Chim. Acta*. 165 (1984) 201–202.
- [29] N. Smart, M. Hitchman, R. Ansell, J. Fortune, Chromium (VI) determination at a rotating disc electrode, *Anal. Chim. Acta*. 292 (1994) 77–80.
- [30] L. Mejtes, Coulometric determination of Chromium, *Anal. Chim. Acta*. 18 (1958) 364–365.
- [31] J. Golimowski, P. Valenta, H.W. Nürnberg, Trace determination of chromium in various water types by adsorption differential pulse voltammetry, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 322 (1985) 315–322.
- [32] M.M. Palrecha, P.K. Mathur, Adsorptive stripping voltammetric determination of chromium in gallium, *Talanta*. 45 (1997) 433–436.

Aplicación del diseño experimental multifactorial
para modelar y optimizar la especiación de Cr
inorgánico mediante voltametría de onda
cuadrada



Pregunta disparadora

¿Es posible desarrollar una técnica electroanalítica teniendo conciencia ecológica? ¿Es posible producir menor cantidad de residuos químicos?

Objetivos

Especiar Cr según su estado de oxidación mediante una técnica electroanalítica.

Conocer la influencia de las distintas variables en la respuesta analítica.

Optimizar la señal electroquímica de la técnica desarrollada mediante diseños experimentales de superficie de respuesta.

Validar la técnica electroanalítica mediante muestras de agua reales y sintéticas.

Importancia del diseño de experimentos como herramienta experimental

El diseño experimental es un conjunto de herramientas estadísticas utilizadas para estudiar el comportamiento de un sistema. El objetivo de trabajar con estas herramientas es conocer los efectos de las variables experimentales en ese sistema [1,2]. Estas herramientas requieren planificar y definir las condiciones en las que se van a realizar los ensayos experimentales, ya que deben realizarse de manera tal que maximicen la información que se puede extraer de un número limitado de experimentos [1].

Este método fue desarrollado originalmente por Fisher en la década de 1930 a través de diseños factoriales y análisis de varianza para la investigación agrícola y biológica. Posteriormente fueron desarrollados varios diseños conocidos como

diseños clásicos, tales como Central Compuesto, Plackett y Burman (1946), y Box y Behnken (1960) [1,2].

La información obtenida a partir de los resultados experimentales del sistema en estudio se puede explicar separándola en dos: la variación generada por el propio sistema y los errores correspondientes a los datos empíricos. Como resultado se obtiene un modelo estadísticamente válido que contiene información sobre los efectos de las condiciones experimentales. Este modelo satisfactorio puede ser utilizado para predecir futuras observaciones dentro del rango estudiado [1].

La superficie de respuesta es otra herramienta estadística que permite inspeccionar de manera visual la respuesta obtenida y modelada permitiendo evaluar la sensibilidad del modelo a dichos factores. Esta metodología de superficie de respuesta en la experimentación química fue discutida por primera vez en la década de 1950 por Box y Wilson. La misma incluyó herramientas matemáticas y estadísticas para el diseño y análisis de superficies de respuesta [1,3].

En la práctica ambos métodos están estrechamente relacionados y el uso de la metodología de superficie de respuesta se basa sin excepción en diseños experimentales. Generalmente se utiliza el término diseño experimental para referirse a las prácticas incluidas en ambos temas [1].

Si bien los orígenes de estas herramientas se remiten a la primera mitad del siglo XX, ha sido durante las últimas dos décadas en que dichas metodologías han tenido un desarrollo considerable tanto en aspectos teóricos como en aplicaciones en escenarios reales [2,3].

La Figura 1, extraída de S.S. Garud et al, Design of computer experiments: A review. Computers and Chemical Engineering 106 (2017) 71–95, muestra la cantidad de artículos publicados en el campo del diseño de experimentos a lo largo de los años.

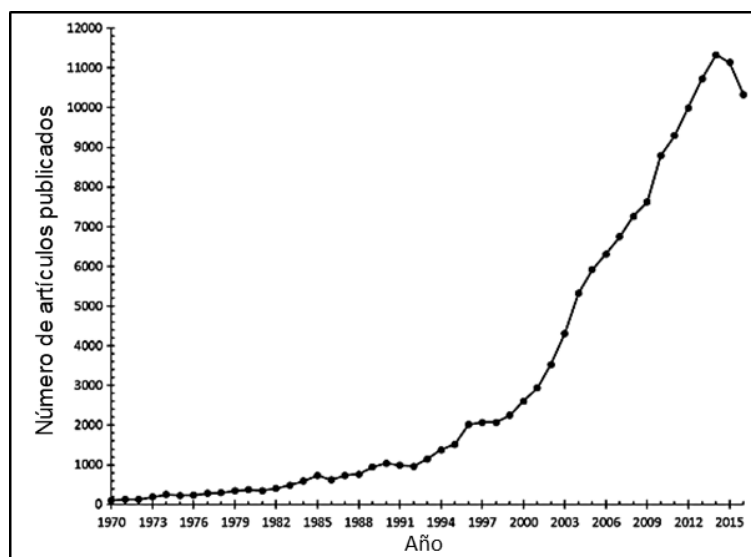


Figura 1: Numero de artículos publicados en el área de diseño de experimentos como herramienta en función a los años. Figura extraída de S.S. Garud et al [2].

Es posible identificar a partir de la Figura 1 que, durante las últimas dos décadas, el uso de estas herramientas en investigación ha tenido un incremento en más de 50 veces. El gran aumento que hubo y que aún en la actualidad se mantengan estos valores, da indicio evidente que esta área sigue en auge.

Estas herramientas son muy utilizadas por la ingeniería de sistemas químicos y de proceso, algunas de las aplicaciones son: diseño de productos y procesos, monitoreo y control de procesos, análisis de viabilidad y flexibilidad, estimación de parámetros, captura de CO_2 , etc. En general, a nivel mundial las áreas de investigación que más utilizan estas estrategias son la ingeniería que contribuye con un 34%, informática con un 31%, medicina con un 17%, las matemáticas con 14%, bioquímica, genética y biología molecular con 10%, agricultura con 8%, ciencias ambientales con 7%, química con 5%, ciencias sociales 4% mientras que otras áreas contribuyen con porcentajes menores al 5% [2]. La suma de estos porcentajes es

mayor a 100, esto se debe a que varios artículos son tenidos en cuenta en diferentes áreas de investigación.

La mayor ventaja de trabajar con diseño experimental es que intentan eliminar o minimizar las correlaciones entre las variables elegidas. Esto se debe a que las variables se modifican simultáneamente, lo que permite una estimación independiente de los efectos de cada variable y sus posibles interacciones [1].

De manera general puede interpretarse a los diseños experimentales como una estrategia de experimentación secuencial y modelación que permite estimar las condiciones óptimas de operación de un proceso y mejorar significativamente su resultado en cuanto a costos, tiempos, eficiencia, productividad, cumplimiento de especificaciones y, en fin, mejorar su calidad [2].

Es necesario aclarar que el término "factor" es muy utilizado en los estudios estadísticos y, en este trabajo doctoral, se utiliza como sinónimo de la palabra variable, utilizada en los estudios experimentales.

Materiales y métodos

Reactivos químicos y soluciones

Todas las soluciones, diluciones y blancos se prepararon con agua ultra-pura (18 MΩ cm) obtenida con un sistema MilliQ de Millipore. Las soluciones reguladoras de pH fueron preparadas con ácido acético (Anedra) y acetato de sodio (Anedra) en una concentración 2 mol L^{-1} y se les ajustó el valor de pH con HCl (Cicarelli) o KOH (Anedra), éste fue controlado antes de cada experimento con un pH-metro con electrodo de vidrio (Mettler Toledo).

Las soluciones de KNO_3 3 mol L^{-1} fueron preparadas exclusivamente con drogas de calidad analítica (Sigma o J. T. Baker). El ligando, ácido

dietilentriaminopentaacético DTPA (Sigma) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ se preparó con la cantidad necesaria de reactivo y, agregándole un 25 % de amoníaco (Suprapur®, Merck) hasta superar $\text{pH} > 6$ para lograr disolverlo completamente.

La solución stock de Cr(VI) se preparó disolviendo $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Cicarelli) mientras que la de Cr(III) a partir de $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt). Como agente oxidante se utilizó C(IV) agregándole la cantidad necesaria de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Anedra) en agua disolviéndolo con calor y H_2SO_4 (Cicarelli) hasta alcanzar un pH menor a 2.

Fundamentos de la técnica de voltamperometría de onda cuadrada

La técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV) se basa en aplicar, sobre una función escalonada de potencial, un perfil de pulsos simétricos de gran amplitud (E_{SW}) como se muestra en la Figura 2 A.

Considerando como reacción inicial $\text{Ox} + \text{ne}^- \rightleftharpoons \text{Red}$, el impulso inverso de potencial causaría la reoxidación del producto, debido a que el módulo de la amplitud es muy grande.

El escalón de potencial (dE) es la magnitud que permite el incremento de la escalera de potencial, el periodo de cada escalón se representa como τ , cada pulso transcurre en $\tau/2$ y la frecuencia de la onda completa está definida como $f = 1/\tau$.

Como respuesta frente a esta excitación se mide la corriente del proceso, registrándose justo en el instante previo de finalizar en cada uno de los pulsos de la onda cuadrada. La corriente medida al finalizar el pulso que tiene el mismo sentido del barrido, se denomina corriente directa (I_d) mientras que la que se lee en el pulso de sentido opuesto es la corriente inversa (I_r), estas se muestran en la Figura 2 B.

Los voltamperogramas $I \text{ vs } E$ se muestran en la Figura 2 C, en verde se representa la corriente obtenida al aplicar el hemiciclo directo (I_d), en azul la corriente del

hemiciclo inverso (I_r) y la diferencia entre $I_d - I_r$ conocida como corriente neta (ΔI) en color rojo.

El aumento en la señal de ΔI que se observa en la Figura 2 C se debe a que I_r tiene valores negativos y al calcular la diferencia entre $I_d - (-I_r)$, se obtiene un valor mayor.

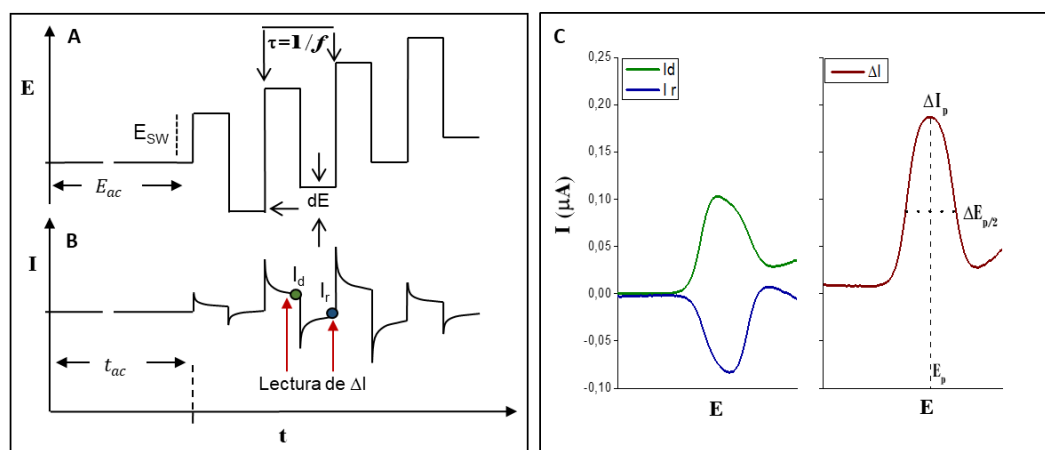


Figura 2: (A) Programa de potencial aplicado vs tiempo, (B) Respuesta de corriente obtenida vs el tiempo y (C) Corriente medida respecto al potencial aplicado.

Los parámetros que caracterizan al perfil voltamétrico son la corriente neta de pico (ΔI_p), el potencial de pico (E_p) y el ancho de medio pico ($\Delta E_{p/2}$).

La técnica de SWV es muy utilizada analíticamente debido a que la altura de pico es proporcional a la concentración y el incremento de la señal de ΔI_p permite usar esta técnica en la detección de trazas.

Las curvas generalmente se asemejan a una campana simétrica pudiendo variar dependiendo de la velocidad y del coeficiente de transferencia de carga, entre otros valores representativos de cada mecanismo de reacción.

Esta técnica presenta como beneficios una excelente sensibilidad, minimiza la corriente de fondo y permite hacer ensayos a altas velocidades de barrido de

potencial. Para aumentar aún más la sensibilidad suele anteceder a la onda cuadrada un potencial de acumulación (E_{ac}) durante un tiempo de acumulación (t_{ac}) lo que permite utilizar la técnica para análisis de trazas y ultra-trazas mediante redisolución [4].

Equipamiento

Las medidas electroquímicas se realizaron con un equipo Autolab (Eco-Chemie, Utrecht, Netherlands), los potenciostatos utilizados fueron PSTAT 20 y PGSTAT101 equipados con los softwares GPES 4.3 y NOVA 1.9 para el manejo de los equipos respectivamente.

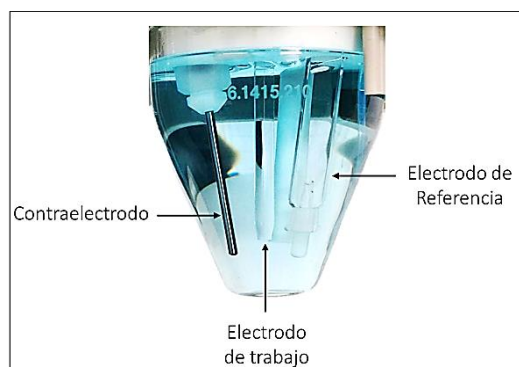


Figura 3: Celda de trabajo del gotero de mercurio.

Todas las medidas electroquímicas de Cr se llevaron a cabo empleando un electrodo gotero de mercurio (VA 663 Metrohm, Switzerland) como electrodo de trabajo, excepto cuando se especifique lo contrario. En la Figura 3 se muestra la celda electroquímica con la disposición de los electrodos. El modo en que se realizaron todos los experimentos fue con gota de mercurio fija (HMDE), permitiendo que una sola gota funcione como electrodo de trabajo, habiendo eliminado previamente 5 gotas, para asegurar que la superficie fuese nueva y se encuentre totalmente limpia.

Las pequeñas gotas tienen un área superficial de $0,40 \text{ mm}^2$ y cabe destacar que en los años de trabajo de tesis no se ha llegado a consumir 5 mL de Hg. Se utilizó una barra de carbono vítreo como contra-electrodo y como electrodo de referencia un electrodo de $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}/\text{KCl}$ (3 mol L^{-1}), su valor de referencia fue utilizado para informar todos los valores de potenciales.

Previo a cada medida, es necesario purgar las muestras con N_2 de alta pureza durante 10 min. Cada barrido de potencial se realizó con una gota nueva de Hg y todas las medidas fueron obtenidas a temperatura ambiente (25°C).

Es importante destacar que el mercurio utilizado en cada experimento podría ser reutilizado. Durante estos años fue desechado, de manera tal que no afectara al ambiente, en bidones de plásticos y enviado a una planta de tratamiento de residuos peligrosos.

Fundamentos del diseño estadístico de experimentos

El diseño experimental es una herramienta estadística utilizada para estudiar y/o mejorar procesos o sistema de manera planeada y óptima, la que intenta suplantar a la tradicional manera de trabajar, conocida como "prueba y error" [1,2,5].

Los diseños estadísticos de experimentos consisten en determinar cuáles pruebas deben realizarse y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, permitan responder las interrogantes planteadas, en un lapso corto de tiempo y utilizando pocos recursos. Consta de aplicar uno o varios tratamientos que modifiquen las condiciones de trabajo del sistema o proceso en estudio, con el objetivo de identificar y valorar las respuestas como también estudiar las razones de las modificaciones de las mismas, atribuyendo los cambios, generalmente a la acción de los tratamientos [5].

En la Figura 4 se muestra un esquema de un proceso típico, teniendo en cuenta que todos los sistemas tienen variables o factores de entrada y de salida.

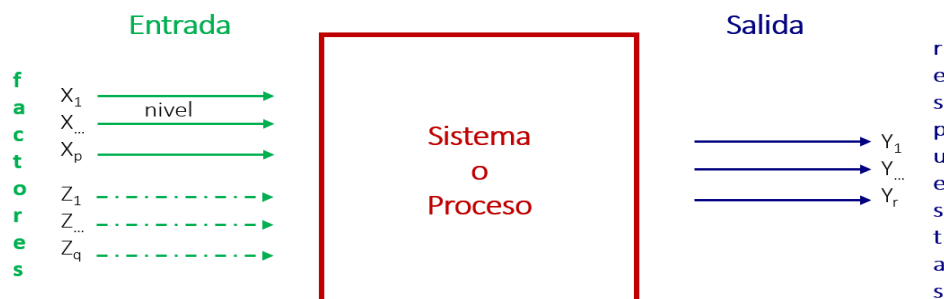


Figura 4: Experimento multifactorial y variables que intervienen en un proceso.

Las variables de entrada se pueden clasificar como: controlables e incontrolables. Los factores controlables (x_1, x_2, \dots, x_p) son las que pueden fijarse a un nivel o valor determinado ya que existe el mecanismo para cambiar su nivel de operación, lo que permite experimentar con éstos. Mientras que los factores incontrolables (z_1, z_2, \dots, z_q) también denominados ruidos, son los que no pueden controlarse durante el experimento. Las variables de salida o respuestas (y_1, y_2, \dots, y_r) son las que permiten conocer el efecto o resultado de cada prueba experimental.

Se reconoce como factores de estudio a las variables que se investigan en el experimento, respecto de cómo afectan a la(s) respuesta(s), reflejándose en su media o en su variabilidad.

Para trabajar con un diseño estadístico de experimentos se deben elegir los factores que puedan tener efecto sobre la respuesta de interés, lográndose mediante un conocimiento previo del sistema en estudio. Los valores que se le asignan a cada

factor estudiado se denominan niveles y la combinación entre los distintos niveles de todos los factores se conocen como tratamiento [5].

Dentro de las formas en que puede abordarse un experimento, está el número de factores que se estudian y se los puede catalogar como: experimento unifactorial cuando se aplica distintos niveles de un factor al sistema y experimento factorial o multifactorial al tratamiento que consiste en la combinación de distintos niveles de dos o más factores.

El objetivo principal del tratamiento estadístico de los resultados de un diseño experimental es proponer un modelo para la respuesta, que tenga en cuenta las fuentes conocidas de variación, los tratamientos y estimar las magnitudes de la contribución de cada tratamiento.

La función (ecuación 1) que representa la respuesta obtenida por un modelo matemático simple de un experimento con a tratamientos, repetidos n veces es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{con } i=1, \dots, a ; j=1, \dots, n \quad (1)$$

Donde Y_{ij} representa la respuesta observada en la unidad experimental j -ésima del tratamiento i -ésimo, μ es la media general de la respuesta, τ_i es el efecto del i -ésimo tratamiento, $\mu + \tau_i$ es la respuesta esperada para el tratamiento i -ésimo y ε_{ij} es el error aleatorio, y representa la diferencia entre lo observado experimentalmente de la unidad j -ésima del tratamiento i -ésimo y la respuesta esperada para ese tratamiento [6].

Para un diseño de experimentos es importante que la variabilidad de las respuestas provenga de las modificaciones de los factores estudiados y que el error aleatorio sea muy pequeño. En los modelos clásicos se considera el error como normalmente distribuido, con una media poblacional nula, varianza σ^2 e

independientes entre sí [6]. La discrepancia entre los valores que indica el modelo y el valor observado se la atribuye al efecto de las variables no estudiadas, la variabilidad entre las mediciones hechas bajo las mismas condiciones y los errores del experimentador.

El diseño estadístico de experimentos tiene como propósito principal desarrollar un proceso robusto, esto implica que la respuesta sufra pocos cambios frente a diferentes fuentes de variabilidad no controlable (z).

El diseño experimental provee una matriz que resume los tratamientos realizados al proceso y las repeticiones necesarias, para obtener la mayor cantidad de información del sistema al menor costo de tiempo, reactivo, recursos, etc.

La Tabla 1 esquematiza un diseño experimental factorial de dos variables de estudio con dos niveles cada una. Cada fila es un tratamiento diferente, los distintos colores indican diferentes combinaciones de los niveles que se aplican al proceso en estudio.

<i>Nº Exp</i>	<i>Factor 1</i>	<i>Factor 2</i>	<i>Respuesta</i>
1	a_1	a_2	y_1
2	b_1	a_2	y_2
3	a_1	b_2	y_3
4	b_1	b_2	y_4

Tabla 1: Matriz de un diseño experimental multifactorial para dos niveles con dos factores cada uno.

Para realizar el estudio estadístico de las respuestas es necesario probar cada tratamiento (experimento) y obtener el correspondiente valor de respuesta y .

El estudio experimental se puede resumir en 4 etapas: Planificación y realización, Análisis estadístico, Interpretación y Conclusiones finales [5].

La *planificación* es la etapa más importante, por lo que lleva más tiempo de dedicación, requiere del *conocimiento preliminar* del sistema en estudio, para esto es necesario investigarlo, poder entenderlo y delimitarlo. En esta fase se eligen las variables de respuesta que se medirán, se determinan los factores de estudio que tienen influencia sobre la respuesta y se seleccionan los niveles de cada factor. Una vez que se define el tipo de *diseño de experimentos* que se realizará, se planea el trabajo experimental y se realizan los experimentos tal como se lo planificó.

El *análisis estadístico* de los resultados utiliza principalmente el test del análisis de la varianza (ANOVA) y tiene en cuenta que los resultados experimentales son observaciones muestrales para realizar las inferencias poblacionales.

La etapa de *interpretación* se apoya en los resultados obtenidos en la fase anterior, se verifican los supuestos y se contrastan conjeturas previas con lo obtenido experimentalmente.

El último paso, para *concluir* el estudio experimental, consta de *elegir* el tratamiento que mejor respuesta provea y que permita generalizar los resultados del estudio. Cuando se trabaja con más de una variable es necesario utilizar alguna herramienta matemática como por ejemplo la función deseabilidad que permite realizar una optimización simultánea.

Metodología de superficie de respuesta

En los párrafos anteriores se resumieron los objetivos de trabajar con diseños factoriales, como así también la metodología de trabajo. La intención de trabajar con diseño de experimentos es estudiar el efecto de varios factores sobre una o más

respuestas para determinar, por ejemplo, la combinación de niveles de los factores donde el desempeño de un proceso sea mejor. La manera de encontrar el nivel de mejoras deseadas es utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR) [7].

La MSR permite encontrar las condiciones óptimas de trabajo, mediante estrategias experimentales y análisis de resultados [8]. Esta metodología implica tres fases: diseño, modelo y técnica de optimización. Las dos primeras etapas se planifican juntas, teniendo en cuenta el comportamiento de la respuesta, de primer orden (planas) o segundo orden (con curvatura).

El modelo utiliza el análisis de regresión lineal múltiple, el cual tiene en cuenta elementos tales como: parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia del modelo, pruebas de falta de ajuste, residuos, predichos, intervalos de confianza para predichos y coeficiente de determinación [8].

La optimización utiliza técnicas matemáticas que permiten explorar el modelo ajustado para obtener la condición óptima de trabajo.

En este trabajo de tesis se utilizaron dos diseños de superficie de respuesta de segundo orden: **Diseño Central Compuesto** y **Diseño de Box-Behnken**. Los diseños de segundo orden permiten estudiar los efectos lineales, las interacciones y efectos cuadráticos, siendo estos últimos los que explican la curvatura del sistema.

El modelo matemático que permite predecir la relación entre las variables independientes y la respuesta para este tipo de diseño se describe en la ecuación 2:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

Donde Y es la respuesta predicha, β_0 es el término independiente, β_i es el coeficiente del término lineal, β_{ii} el coeficiente del término cuadrático, β_{ij} corresponde al efecto de la interacción y ε es el error aleatorio [7].

Estos tipos de diseños requieren al menos tres niveles por factor además que cumplan con las propiedades de ortogonalidad y rotabilidad, las que facilitan la correcta estimación de los parámetros del modelo. La propiedad de rotabilidad en un diseño permite lograr una calidad de predicción invariante en cualquier punto del diseño equidistantes del centro del mismo. Por otra parte, la ortogonalidad en el diseño evita que los coeficientes del modelo ajustado estén correlacionados entre sí [9].

Diseño central compuesto

El diseño central compuesto (DCC) es, probablemente, el más utilizado dentro de los diseños experimentales de superficie de respuesta de segundo orden, debido a que puede construirse a partir de diseños más simples agregándole algunos puntos particulares.

El número total de ensayos (N) para este tipo de diseño está dado por $N = 2^k + 2k + n_0$ donde k es el número total de factores. Este diseño está compuesto por una parte factorial, puntos centrales (n_0) y puntos axiales (α). La parte factorial, representa valores mínimos y máximos de cada factor. Los puntos axiales se encuentran a una distancia α del punto central, proveyéndole la característica de ser ortogonal, esta distancia se calcula como $\alpha = (n_f)^{\frac{1}{4}}$. Las repeticiones del punto central pueden ser elegir de distintas maneras, una de ellas se determina según $n_0 = 4(n_f)^{1/2} + 4 - n_f$ dándole el carácter de rotabilidad al diseño, donde n_f es el número de puntos correspondiente a la parte factorial ($n_f = 2k$) [9].

Las posiciones de los puntos mencionados anteriormente se muestran en la Figura 5, la que representa un diseño central compuesto para tres factores.

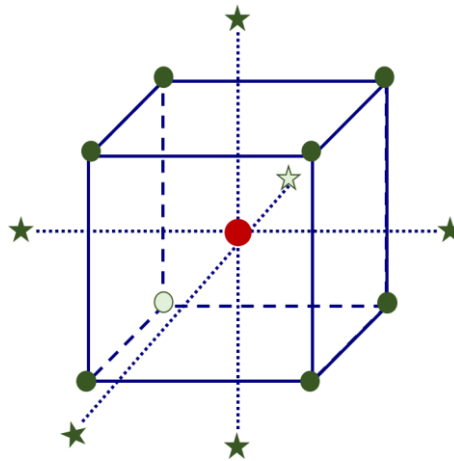


Figura 5: Representación de un DCC para 3 factores, donde se representan los puntos factoriales (n_f :●), el punto central (n_0 :●) y los puntos axiales (α :★).

Los círculos verdes representan la parte factorial del diseño, el rojo al punto central del diseño y las estrellas son los puntos axiales.

Diseño de Box-Behnken

El Diseño de Box-Behnken (DBB) se utiliza cuando se tienen tres o más factores, es un diseño eficiente en cuanto al número de tratamientos

$N = 2k(k - 1) + n_0$ y es rotatable o casi rotatable. Éste se distingue debido a que no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental, creado por los límites máximos y mínimos de cada variable. Tampoco tiene puntos axiales, permitiendo trabajar en la zona de operación segura. Otro beneficio es que propone un bajo número de tratamientos a realizar [9].

En la Figura 6 se muestra la representación geométrica de dicho diseño para tres variables. Se puede observar que los puntos experimentales se ubican en el medio

de las aristas, esto se debe a que en cualquier tratamiento alguno de los factores se fija en la mitad de su rango.

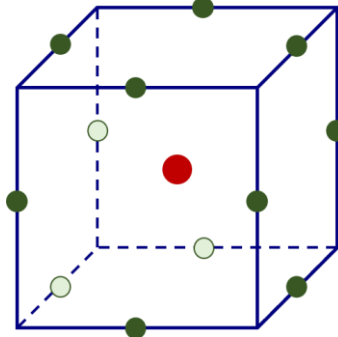


Figura 6: Representación de un DBB para 3 factores donde se representan los puntos factoriales (n_f :●), el punto central (n_0 :●)

Optimización simultánea y función deseabilidad

Una vez elegido y realizados los ensayos provistos por el diseño de experimentos, luego de conocer el modelo matemático que mejor explique la respuesta del sistema, se busca la mejor combinación de las variables experimentales para lograr, por ejemplo, una mejor señal.

Quizá la manera más intuitiva de trabajar para la optimización simultánea de respuestas es con un método gráfico, el cual requiere para lograr la optimización de la/s respuesta/s superponer las superficies de respuestas obtenidas, en la región experimental, y detectar las subregiones en las cuales todos los modelos predicen valores aceptables para la respuesta. Esto es fácil cuando se tienen solo dos factores, ya que en la superficie de respuesta se pueden dibujar cuadrados o círculos centrados en el origen cuando la superficie está representada mediante sus curvas de nivel (superficie de contorno).

Al trabajar con tres variables o más comienza a ser más complicada la interpretación de los resultados, debido a que la región experimental es una esfera o un cubo centrado en el origen en el que se realizan superposiciones de superficies de contorno, lo que requiere fijar uno de los factores por vez para realizar distintos cortes a la figura. De esta manera se obtienen hipersuperficies a las que solo se le pueden realizar cortes bidimensionales y para encontrar las regiones factibles sería necesario superponer los diferentes planos.

Otra técnica para encontrar el punto óptimo es conocido como el método de la función deseabilidad, desarrollado por Harrington con mejoras planteadas por Derringer y Suich [9]. Esta técnica convierte las respuestas en una sola función: deseabilidad, la cual presenta una escala que varía desde 0 a 1. Ésta, se define en el espacio de los factores estimando la deseabilidad en cada punto, convirtiendo la optimización multivariada en un problema univariado.

Se emplea esta nueva función con el objetivo de predecir respuestas de la variable dependiente, tal que se buscan los valores de los factores independientes que predigan la mejor respuesta de deseabilidad, maximizándola. Un resultado de la función cercano a cero representa una situación indeseable, mientras que un máximo de deseabilidad (igual a 1) representa el óptimo de dicha función y con ello se obtiene la mejor combinación de factores para lograr la respuesta [5].

Programa para diseño estadístico de experimentos

El programa utilizado tanto para realizar los diseños estadísticos de experimentos como para la optimización de las respuestas fue Designe Expert 7.0.0.

Parte experimental

Método analítico sin agente oxidante: Método 1

A mediados de la década de los ochenta se logró desarrollar un método voltamétrico para la detección y especiación del Cr. Ésta es una técnica electroquímica de redisolución catódica catalítica utilizada para la determinación de niveles trazas del metal [10].

Este método consta de dos etapas sucesivas, una de acumulación y la segunda de redisolución. Durante la primera etapa se logra la acumulación por adsorción del complejo $\text{Cr(III)} - \text{DTPA}$ sobre la superficie del electrodo de trabajo. La metodología consta de aplicar durante un cierto tiempo ($t_{ac} \cong 60 \text{ s}$) un potencial lo suficientemente negativo ($E_{ac} \cong -1 \text{ V}$), para asegurar que el Cr presente en las cercanías del electrodo se encuentre como la especie reducida (Cr(III)) y en presencia del ligando DTPA se forme el complejo y se acumule en la superficie del electrodo. Este complejo sería electroactivo y presenta una relación molar ligando y el metal de 1:1 [11]. En el próximo capítulo se muestran los diagramas de distribución de especie en función al pH, tanto para el DTPA como para el complejo $\text{Cr(III)} - \text{DTPA}$.

En la etapa de redisolución, según bibliografía, durante los pulsos de potenciales aplicados mediante SWV ocurre la reducción del complejo de Cr: $\text{Cr(III)} - \text{DTPA}$ a $\text{Cr(II)} - \text{DTPA}$ [10]. Esta reducción da lugar a la señal de corriente utilizada analíticamente para la cuantificación de Cr, ya que es proporcional a la concentración de Cr en solución.

La presencia de iones nitratos dan lugar a un ciclo catalítico valioso debido a que incrementa notablemente la corriente debida a la reducción del Cr(III) que forma parte del complejo a Cr(II) , ya que regenera la especie Cr(III) [12].

Mediante esta técnica se logra diferenciar Cr(VI) de Cr(III) ya que el protocolo propone, como estrategia analítica, realizar dos medidas consecutivas de las muestras, una al momento que se le agrega el DTPA, $t = 0$ y la segunda luego de transcurrida una hora. En la primer medida se cuantifica el $Cr_{total} = Cr(VI) + Cr(III)$ y durante la segunda, el Cr(VI). La concentración de Cr(III) se obtiene por diferencia entre los valores determinados en la medidas propuestas [10].

La determinación de la concentración de Cr(III) de manera directa podría estar disminuida debido a que en el pH de trabajo (pH=6,5) se forma $Cr(OH)_3$ en el seno de la solución y precipita ($K_{ps} = 7 \times 10^{-29}$) sin adsorberse significativamente sobre la superficie del electrodo, este fenómeno se observa experimentalmente mediante un decaimiento en la señal, la cual llega a ser nula después de cierto tiempo. Sin embargo, al realizar la reducción electroquímica de Cr(VI) a Cr(III) aplicando el potencial de acumulación, es posible lograr la adsorción del complejo $Cr(III) - DTPA$ cuando este se forma sobre la superficie del electrodo [12].

De manera gráfica se muestra en la Figura 7 el esquema de trabajo y de potenciales utilizados en esta metodología.

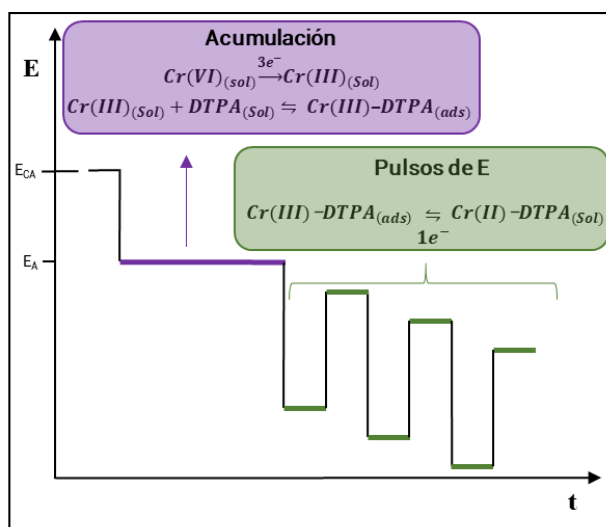
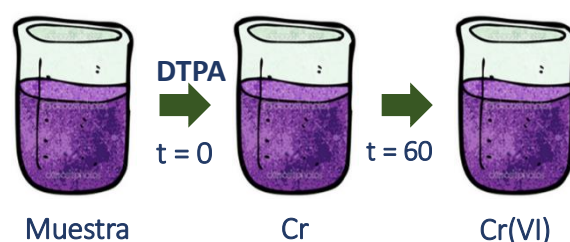


Figura 7: Esquema de trabajo y de potenciales para la especiación de Cr con el método analítico sin agente oxidante.

Las condiciones propuestas para la detección son 0,5 M KNO_3 , 0,05 M CH_3COONa y ajustar el pH de la muestra [10]. Antes de comenzar con las medidas electroquímicas, es necesario purgar la muestra por 5 min con N_2 , luego se agrega el DTPA para lograr una concentración final de 5 $mmol L^{-1}$. El protocolo propone aplicar un $E_{ac} = -1 V$ durante un $t_{ac} = 60 s$ al mismo tiempo que se agita la solución, una vez finalizado este tiempo, se esperan 10 s para que la solución se aquiete y poder registrar el voltamperograma al realizar el barrido de potencial desde $-1 V$ hasta $-1,5 V$.

La cuantificación de Cr(III) se logra al restar el valor de ΔI_p correspondiente a la señal obtenida a $t = 0$ menos ΔI_p de la señal obtenida a $t = 60$ s: $(\Delta I_p)_{Cr(III)} = (\Delta I_p)_{Cr_{total}} - (\Delta I_p)_{Cr(VI)}$.

Método analítico con agente oxidante: Método 2

En este trabajo doctoral se propone una modificación al protocolo de bibliografía, método 1, utilizado para la detección diferenciada de las dos especies más comunes de Cr. Este nuevo método se muestra de manera esquemática en la Figura 8.

La cuantificación de las distintas especies de Cr, en este protocolo modificado, plantea separar en dos alícuotas a la muestra a especiar. Una destinada a la cuantificación de Cr(VI) y con la segunda alícuota se determina Cr_{total} .

La cuantificación de Cr(VI) se realiza de igual manera que el método bibliográfico explicado en el apartado anterior, salvo que el tiempo de espera luego de agregar el ligando es de 30 minutos. Por otra parte, la determinación de Cr_{total} requiere de un tratamiento previo con un agente oxidante (Ce(IV)).

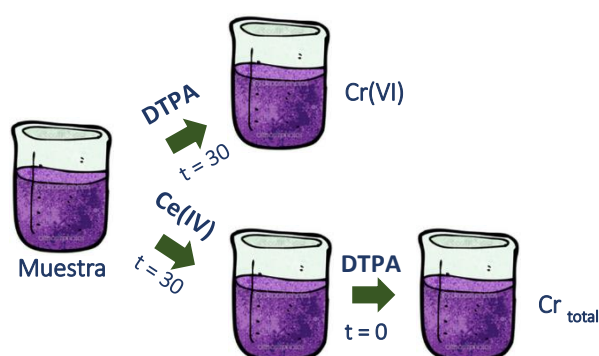


Figura 8: Esquema de trabajo para especiación de Cr determinada con el Método 2.

La cuantificación de Cr_{total} se logra al hacer reaccionar la segunda alícuota de la muestra con Ce(IV) en exceso durante media hora a 50°C. De esta manera, este

cación, que se comporta como agente oxidante, permite que todo el Cr(III) presente en la solución se oxide a Cr(VI). Al estar todo el Cr como la especie oxidada en solución se evitaría el decaimiento de la señal analítica debida a la formación de $Cr(OH)_3$.

La estrategia electroquímica para la determinación de Cr en ambas muestras sigue los pasos presentado en el apartado anterior: se aplica un $E_{ac} = -1\text{ V}$ durante un $t_{ac} = 60\text{ s}$ al mismo tiempo que se agita la solución, una vez finalizado este tiempo, se realiza el barrido de potencial desde -1 V hasta $-1,5\text{ V}$ y se registran los voltamperogramas. La cuantificación de Cr(III) se logra restando el valor de ΔI_p correspondiente a la señal de la alícuota 2 Cr_{total} menos ΔI_p de la primer alícuota:

$$(\Delta I_p)_{Cr(III)} = (\Delta I_p)_{Cr_{total}} - (\Delta I_p)_{Cr(VI)}.$$

Resultados y discusión

Método analítico sin agente oxidante: Método 1

La detección electroquímica de Cr se evaluó mediante el método 1, sin el agregado de un agente oxidante.

La Figura 9 muestra la dependencia de la corriente neta ΔI_p obtenida mediante SWV en función del tiempo. Las respuestas que se muestran corresponden a tres soluciones con distintas especies de Cr: el Cr(VI) se representa con triángulos color bordó (▲), el Cr(III) con cuadrados azules (■) y la mezcla de ambas especies con círculos verdes (●).

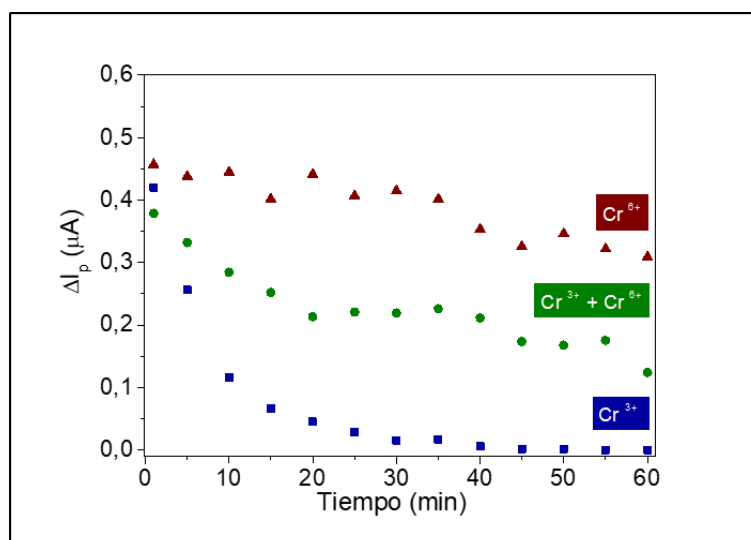


Figura 9: Dependencia de ΔI_p en función del tiempo, obtenida por SWV para las especies de Cr(VI) (\blacktriangle), Cr(III) (\blacksquare) y una mezcla de ambas (\bullet), determinadas por el método 1. Los valores experimentales son medidos para $K_2Cr_2O_7 = 1 \mu mol L^{-1}$, $KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O = 2 \mu mol L^{-1}$, los parámetros químicos utilizados: $DTPA = 5,5 mmol L^{-1}$, $KNO_3 = 0,5 mol L^{-1}$, $pH = 6,5$ y $Sol_{Reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$. Los parámetros instrumentales para la técnica de SWV son: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 60 s$, $E_{SW} = 50 mV$, $dE = 5 mV$ y $f = 100 Hz$.

Los valores de ΔI_p registrados para cada punto del gráfico de la Figura 9 correspondería a la reducción del complejo $Cr(III) - DTPA$ a $Cr(II) - DTPA$ en función del tiempo de reacción entre el Cr en solución y el DTPA para tres muestras, todas con una concentración de Cr_{total} de $2 \mu mol L^{-1}$ (la mezcla fue preparada con $1 \mu mol L^{-1}$ de cada una de las especies).

En general, puede observarse el decaimiento de la señal de ΔI_p a medida que transcurre el tiempo, tal como se describe en bibliografía [13]. Al colocar inicialmente solución de Cr(III) el valor de ΔI_p disminuye hasta alcanzar valores muy cercanos a cero luego de 30 min. El decaimiento observado para la solución de Cr(VI) a los 30 min no supera un 10% de la corriente inicial, valor similar al informado en bibliografía [14] y la mezcla de ambas especies presenta un comportamiento que resulta de la

combinación de ambas, con un gran decaimiento a tiempos cortos hasta lograr un valor aproximadamente constante correspondiente a la especie más oxidada de Cr.

Por otra parte, se puede destacar la diferencia entre los valores de ΔI_p a $t = 0$ para las distintas soluciones, aunque éstas se prepararon con iguales concentraciones. Esta variabilidad lleva a un cálculo erróneo de la concentración de Cr(III) en las muestras problemas, ya que se determina a partir de la resta de los valores experimentales.

Con la intención de disminuir la variabilidad en las respuestas, es que se decidió modificar la metodología de trabajo para lograr la especiación de Cr.

Método analítico con agente oxidante: Método 2

El Método 2 fue evaluado en función del tiempo para verificar, por una parte, que las señales de corriente correspondiente a las distintas especies se comporten como la especie más oxidada de Cr, y por otra, que la variabilidad de las señales sean menores al 10%.

En la Figura 10 se muestra la variación de ΔI_p en función del tiempo, asignada dicha señal a la reducción del complejo $Cr(III) - DTPA$ a $Cr(II) - DTPA$. Las dos muestras analizadas contenían inicialmente Cr(VI) (triángulos bordó) o Cr(III) (cuadrados azules). Ambas soluciones tienen una concentración de $2 \mu mol L^{-1}$ y fueron tratadas con Ce(IV), previo a la detección electroquímica.

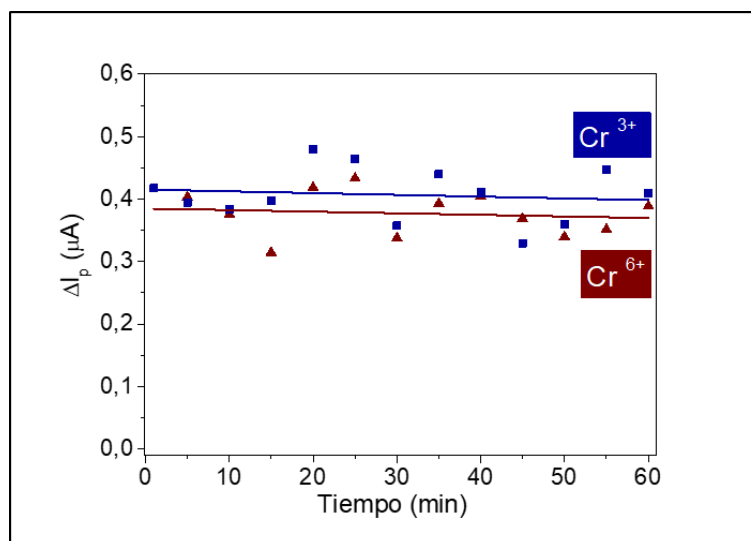


Figura 10: Dependencia de ΔI_p en función del tiempo, obtenida por SWV para soluciones de $1 \mu mol L^{-1}$ de $K_2Cr_2O_7$ (\blacktriangle) y $2 \mu mol L^{-1}$ de $KCr(SO_4) \cdot 12H_2O$ (\blacksquare) determinadas por el método 2. Los parámetros químicos utilizados: $DTPA = 5,5 mmol L^{-1}$, $Ce(IV) = 0,2 mol L^{-1}$, $KNO_3 = 0,5 mol L^{-1}$, $pH = 6,5$ y $Sol_{Reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$. Los parámetros instrumentales para la técnica de SWV son: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 60 s$, $E_{SW} = 50 mV$, $dE = 5 mV$ y $f = 100 Hz$.

Se puede observar en el gráfico de la Figura 10, que para ambas muestras la ΔI_p se mantiene prácticamente constante a medida que transcurre el tiempo de reacción. Mediante la prueba t de student (test T) para muestras independientes, se obtuvo un $p\text{-valor} = 0,07$, lo que permite concluir que no existe evidencia significativa para negar la igualdad de las medias de las muestras.

De esta manera se demuestra que al tratar las muestras con el agente oxidante se logra un mismo comportamiento para ambas especies de Cr, por lo que es factible utilizarla para la especiación de las mismas, ya que el cálculo de la concentración de la especie reducida de Cr presentaría menor error que con el método 1.

Diseño factorial de experimentos

Planificación: conocimiento preliminar del sistema en estudio

Para lograr la tarea de reconocimiento del sistema de detección de Cr, lo primero que se realizó fue separar los factores controlables en tres grandes grupos: Variables Electroquímicas, Variables de Preconcentración y Variables Químicas.

Las variables electroquímicas de la técnica de SWV fueron: Amplitud (E_{SW}), frecuencia (f), escalón (dE). El tiempo (t_{ac}) y el potencial de acumulación (E_{ac}) fueron los factores de preconcentración evaluados. Al mismo tiempo el estudio del efecto de E_{ac} , evalúa la ventana de potencial de trabajo, ya que el barrido de redisolución se realiza desde el valor de potencial en el cual se acumula la especie hasta el potencial donde comienza el desprendimiento de hidrógeno, que es aproximadamente -1,5 V.

El grupo de las variables químicas reúne factores como pH y concentración de la solución reguladora [$Sol_{Reguladora}$], del ligando [DTPA], del electrolito soporte [KNO_3] y del agente oxidante [$Ce(SO_4)_2$].

Todos los experimentos realizados en esta etapa fueron probados con una concentración de Cr(VI) $0,3 \mu mol L^{-1}$

En la Figura 11 se muestra la dependencia de ΔI_p obtenida mediante SWV que correspondería a la reducción del complejo $Cr(III) - DTPA$ a $Cr(II) - DTPA$ en función de las variables electroquímicas: amplitud (Figura 11 A) y frecuencia (Figura 11 B).

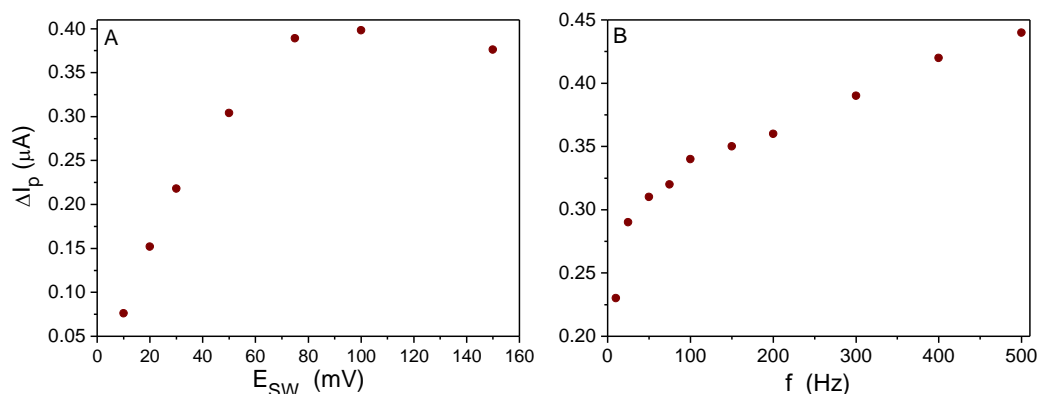


Figura 11: Dependencia de ΔI_p en función a las variables electroquímicas E_{SW} (A) y f (B). Los valores experimental son medidos para $K_2Cr_2O_7 = 1 \mu mol L^{-1}$. Los parámetros químicos utilizados: $DTPA = 5,5 mmol L^{-1}$, $Ce(IV) = 0,2 mol L^{-1}$, $KNO_3 = 0,5 mol L^{-1}$, $Sol_{Reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$ y $pH = 6,5$. Los parámetros instrumentales para la Figura A: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 30 s$, $dE = 5 mV$ y $f = 100 Hz$ y para la Figura B: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 30 s$, $dE = 5 mV$ y $E_{SW} = 0,05 V$.

Se puede observar de la Figura 11 A, el gran incremento en la señal a medida que aumenta la amplitud hasta 80mV, hasta llegar a un valor prácticamente constante. El E_{SW} está relacionado con la energía que se le aplica al sistema para que ocurra un determinado proceso, al aumentar el E_{SW} se observa un incremento de corriente, ya que se entrega energía suficiente para que ocurra el proceso electroquímico. Por otra parte, el decaimiento de corriente que se observa para $E_{SW} = 150 mV$ podría deberse a que al superarse ampliamente el potencial termodinámico ya no se estaría favoreciendo el proceso de reducción.

En la Figura 11 B puede observarse incremento en la respuesta debido al aumento en la frecuencia. La f está vinculada con el tiempo de cada pulso según: $\tau = f^{-1}$, por ese motivo es que a mayor frecuencia, para un mismo tiempo, se aplican mayor número de pulsos, lo que se observa experimentalmente como un aumento en la señal de corriente.

El escalón de potencial, dE , también fue evaluado, aunque no se muestran los resultados obtenidos, presenta una respuesta similar a la de la amplitud.

Las variaciones de la señal de corriente neta respecto a las variables de pre-concentración se muestran en la Figura 12, en particular, los cambios de ΔI_p respecto al potencial de acumulación (Figura 12 A) y los del tiempo de acumulación (Figura 12 B).

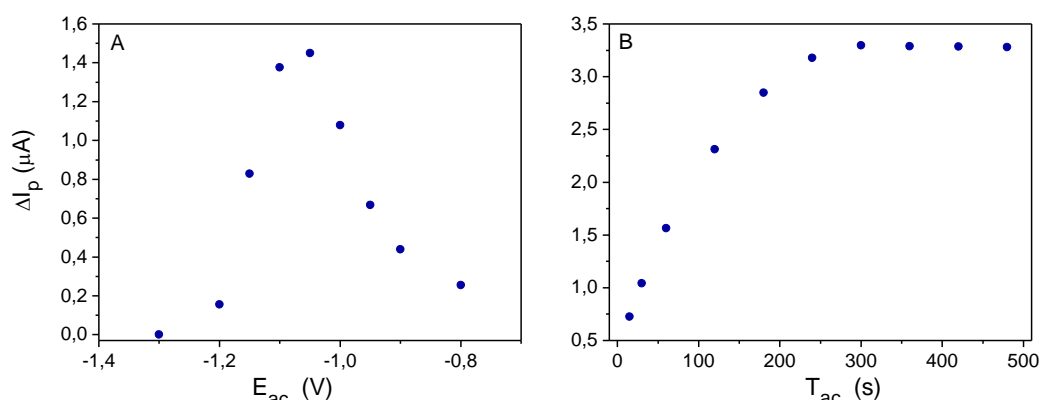


Figura 12: Dependencia de ΔI_p en función de las variables electroquímicas E_{ac} (A) y t_{ac} (B) para la redisolución por SWV del complejo $Cr(III) - DTPA$. Los valores experimental son medidos para $K_2Cr_2O_7 = 1 \mu mol L^{-1}$. Los parámetros químicos utilizados: $DTPA = 5,5 mmol L^{-1}$, $Ce(IV) = 0,2 mol L^{-1}$, $KNO_3 = 0,5 mol L^{-1}$, $pH = 6,5$ y $Sol_{Reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$. Los parámetros instrumentales para la Figura A: $t_{ac} = 30s$, $dE = 5 mV$, $E_{SW} = 0,05 V$ y $f = 100 Hz$ y para la Figura B: $E_{ac} = -1,1 V$, $dE = 5 mV$, $E_{SW} = 0,05 V$ y $f = 100 Hz$.

Como puede observarse de la Figura 12 A, se obtiene un máximo de corriente para $E_{ac} = -1,05 V$. Este parámetro está relacionado con la energía que se aplica al sistema para que se reduzca el $Cr(VI)$ (que se encuentra en las cercanías del electrodo) a $Cr(III)$, por lo que, al aplicar un potencial más negativo, mayor cantidad de iones se estarían reduciendo. Una vez que el potencial aplicado es suficiente para que todas las especies en las vecindades del electrodo se reduzcan, los iones deben difundir desde una distancia mayor, resultando en una disminución de corriente.

En relación al tiempo de acumulación, como se puede ver en la Figura 12 B, hay un incremento de ΔI_p al aumentar t_A , hasta llegar a un valor constante a 300 s. Este aumento se atribuye al incremento de la concentración de iones Cr en la cercanía del electrodo, mientras más tiempo se aplica el potencial correspondiente, mayor será la concentración disponible de los mismos para formar el complejo activo responsable de la señal analítica hasta saturar la superficie, logrando un máximo de acumulación en la interfaz electrodo/solución.

El análisis de las variables químicas comprendió variaciones tanto del pH como de la concentración de DTPA, $Sol_{Reguladora}$, KNO_3 y $Ce(SO_4)_2$.

En la Figura 13 se muestra la dependencia de la ΔI_p que correspondería a la reducción del complejo $Cr(III) - DTPA$ en función a la concentración de DTPA (Figura 13 A) y pH (Figura 13 B).

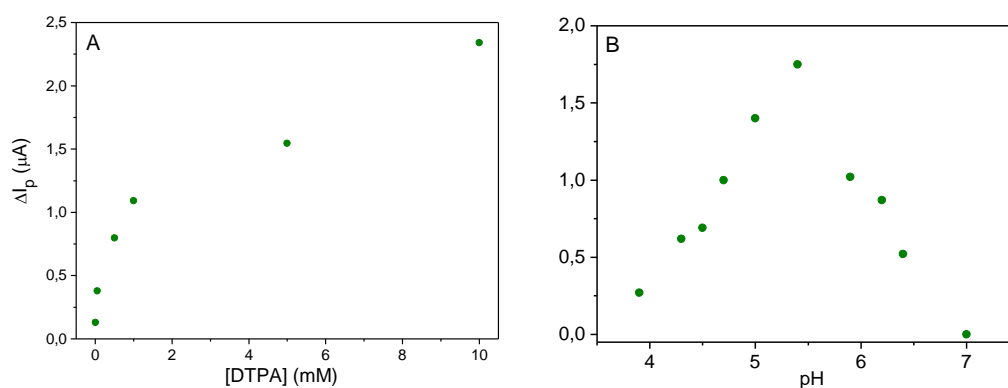


Figura 13: Dependencia de ΔI_p en función a las variables químicas: [DTPA] (A) y pH (B). Los valores experimental son medidos para $K_2Cr_2O_7 = 1 \mu mol L^{-1}$. Los parámetros instrumentales para la técnica de SWV son: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 60 s$, $E_{SW} = 50 mV$, $dE = 5 mV$ y $f = 100 Hz$. Los parámetros químicos para la Figura A: $KNO_3 = 0,5 mol L^{-1}$, $Sol_{Reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$ y $pH = 6,5$ y para la Figura B: $KNO_3 = 0,5 mol L^{-1}$, $Sol_{Reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$ y $DTPA = 1,0 mmol L^{-1}$.

Puede observarse, de la Figura 13 A, que en todo el intervalo de concentración evaluado hay un incremento en la señal. Inicialmente este aumento es muy abrupto, suavizándose para concentraciones mayores a $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de DTPA.

De la Figura 13 B puede verse que ΔI_p alcanza un máximo para un valor de pH = 5,5. El rango de pH en el que se obtuvo señal fue de 3,8 a 7, puede observarse del gráfico que la corriente decrece y en los valores extremos la respuesta es muy baja, a valores menores que 3,8 o mayores a 7 la corriente fue de cero. Esto último podría deberse al hecho que el complejo formado a pH bajos no es el más estable [15], mientras que a pH altos precipitaría el $\text{Cr}(\text{OH})_3$.

Las otras variables químicas fueron evaluadas, pero los gráficos no se muestran, ya que siguen tendencias similares a la Figura 13 A. En todos los casos la señal se incrementa con el aumento de las concentraciones, en los rangos evaluados, tanto para el $\text{Sol}_{\text{Reguladora}}$, el KNO_3 como para el $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$.

En base a estos resultados se eligieron los intervalos de trabajo para las variables controlables con las que se trabajaría posteriormente en los diseños de experimentos, dicha información se resume en la Tabla 2.

Variable	Intervalo
t_{ac} (s)	10 ; 120
E_{ac} (V)	-0,95 ; -1,15
f (Hz)	10 ; 500
E_{sw} (V)	0,01 ; 0,10
dE (mV)	0,5 ; 10
pH	5,0 ; 6,5
[DTPA](mM)	1,5 ; 5,5

Tabla 2: Niveles de las variables controlables del sistema para la detección de Cr.

Los rangos de cada variable se eligieron de manera tal que contengan al valor máximo de ΔI_p obtenida.

Los factores que no se tuvieron en cuenta para el diseño de experimentos fueron fijados a un valor determinado:

- Concentración de solución reguladora: $0,5 \text{ mol L}^{-1}$
- Concentración de KNO_3 : $0,5 \text{ mol L}^{-1}$
- Concentración de oxidante Ce(IV): $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$

Se decidió trabajar con concentraciones fijas debido a que siempre se encuentran en exceso respecto al analito y se determinó que no era relevante analizar la influencia de estos parámetros en el sistema bajo estudio.

Diseño estadístico de experimentos

Para la instancia del diseño experimental, luego del conocimiento del sistema, se dividieron las variables en dos grandes grupos: Variables Químicas y Variables Instrumentales. Previo a la división de variables se probó realizar un diseño estadístico de experimentos incluyendo todas las variables, 5 instrumentales (t_{ac} , E_{ac} , dE , E_{SW} y f) y 3 químicas (pH, [DTPA] y $[KNO_3]$) del cual no se muestran los resultados. Con este diseño no se encontró un modelo matemático adecuado para la respuesta evaluada y, por otra parte, se obtuvieron interacciones entre las variables sin sentido analítico. Por estas razones se decidió dividir las en los grupos antes mencionados.

Las variables químicas incluyen el valor de pH y la concentración de ligando [DTPA] en mmol L^{-1} , y se eligió trabajar con un DCC, ya que este diseño de segundo orden, además de ser flexible, permite el estudio de dos factores. Por otra parte se

analizaron las variables instrumentales mediante DBB, estas fueron:

t_{ac} , E_{ac} , dE , E_{SW} y f .

En la Tabla 3 se resumen los tres niveles (mínimo, medio y máximo) de los factores involucrados en los dos diseños de superficies de respuesta y los valores de los puntos axiales para el DCC. Estos niveles son los representados en las Figuras 5 para el diseño central compuesto y 6 para el Box-Behnken.

La respuesta analizada fue la señal electroquímica, obtenida mediante SWV, correspondiente a la ΔI_p .

Variable	Niveles DCC				
	$-\alpha$	mínimo	central	máximo	$+\alpha$
pH	4,69	5,00	5,75	6,50	6,81
[DTPA]	0,67	1,50	3,50	5,50	6,33

Variable	Niveles DBB		
	mínimo	central	máximo
f	10	255	500
E_{SW}	0,01	0,055	0,1
dE	0,5	5,25	10
t_{ac}	10	65	120
E_{ac}	-0,95	-1,05	-1,15

Tabla 3: Niveles de los diseños: Central Compuesto (DCC) y Box-Behnken (DBB).

En la Tabla 4 se presenta la combinación de los diferentes niveles de las dos variables químicas, resumiendo los trece experimentos propuestos por el DCC. Los distintos ensayos se representan en filas de diferentes colores: el azul corresponde a los puntos factoriales, el verde a los puntos centrales y el rojo a los puntos axiales.

Cabe destacar que los trece experimentos que propone el DCC cumplen con la ecuación que resume los números de ensayos: $N = 2^k + 2k + n_0$, teniendo en cuenta que son dos variables las estudiadas, cuatro puntos corresponden a la parte factorial del diseño (+1,+1 ; -1,-1 ; +1,-1 ; -1,+1), cuatro puntos son axiales (+ α ,0 ; - α ,0 ; 0,+ α ; 0,- α) y se realizaron cinco réplicas del punto central (0,0).

Experimento	pH	DTPA
1	6,5	5,5
2	5,75	3,5
3	6,5	1,5
4	4,69	3,5
5	5,75	3,5
6	5	1,5
7	5,75	0,67
8	5,75	3,5
9	5,75	3,5
10	6,81	3,5
11	5,75	3,5
12	5	5,5
13	5,75	6,33

Tabla 4: Combinación de niveles del Diseño Central Compuesto.

Con el diseño de Box-Behnken para las cinco variables estudiadas en esta etapa, se realizaron cuarenta y seis experimentos, cuarenta correspondientes a los puntos factoriales y seis réplicas del punto central, tal como predice la ecuación de número total de ensayos de este tipo de diseño: $N = 2k(k - 1) + n_0$.

En la Tabla 5 se muestran los distintos ensayos propuestos por el DBB, los cuales requieren la combinación de los tres niveles de cada factor. Los experimentos correspondientes a la parte factorial del diseño se representan en azul y en verde las réplicas del punto central.

Experimento	F	dE	ESW	t _{ac}	E _{ac}
1	255	0,01	0,1	65	-1,05
2	10	0,0005	0,055	65	-1,05
3	255	0,0005	0,055	120	-1,05
4	255	0,00525	0,055	120	-1,15
5	255	0,01	0,01	65	-1,05
6	255	0,00525	0,01	65	-1,15
7	255	0,00525	0,1	65	-1,15
8	10	0,00525	0,055	65	-0,95
9	255	0,00525	0,01	10	-1,05
10	255	0,01	0,055	65	-1,15
11	255	0,00525	0,055	65	-1,05
12	500	0,01	0,055	65	-1,05
13	255	0,00525	0,1	10	-1,05
14	10	0,00525	0,055	65	-1,15
15	255	0,00525	0,055	120	-0,95
16	255	0,00525	0,055	10	-0,95
17	255	0,00525	0,01	120	-1,05
18	10	0,00525	0,1	65	-1,05
19	255	0,0005	0,01	65	-1,05
20	255	0,0005	0,055	10	-1,05
21	255	0,00525	0,055	65	-1,05
22	10	0,01	0,055	65	-1,05
23	500	0,00525	0,1	65	-1,05
24	500	0,0005	0,055	65	-1,05
25	255	0,00525	0,1	120	-1,05
26	10	0,00525	0,01	65	-1,05
27	500	0,00525	0,01	65	-1,05
28	255	0,0005	0,055	65	-0,95
29	500	0,00525	0,055	10	-1,05
30	255	0,00525	0,055	65	-1,05
31	255	0,00525	0,1	65	-0,95
32	500	0,00525	0,055	120	-1,05
33	500	0,00525	0,055	65	-1,15
34	10	0,00525	0,055	10	-1,05
35	255	0,01	0,055	120	-1,05
36	255	0,01	0,055	65	-0,95
37	255	0,00525	0,055	65	-1,05
38	255	0,00525	0,01	65	-0,95
39	255	0,00525	0,055	65	-1,05
40	255	0,01	0,055	10	-1,05
41	255	0,00525	0,055	10	-1,15
42	500	0,00525	0,055	65	-0,95
43	255	0,00525	0,055	65	-1,05
44	255	0,0005	0,055	65	-1,15
45	10	0,00525	0,055	120	-1,05
46	255	0,0005	0,1	65	-1,05

Tabla 5: Combinación de los parámetros del Diseño Box-Behnken.

Teniendo en cuenta los dos diseños utilizados, para las 7 variables estudiadas, se realizaron un total de 59 experimentos. Este bajo número de tratamientos realizados

permitieron conocer el comportamiento del sistema frente a cada una de las variables, teniendo en cuenta las interacciones entre las mismas. Determinar las interacciones resulta ser una ventaja respecto al estudio univariado, debido a que se pueden obtener conclusiones más certeras del sistema y encontrar, por ejemplo, condiciones óptimas de trabajo que provea una mayor señal respecto de la modificación independiente de cada factor.

En el siguiente apartado se muestra el análisis estadístico realizado a la respuesta mediante ambos diseños, para conocer el sistema en estudio.

Análisis estadístico

Optimización de variables químicas

Los resultados obtenidos experimentalmente, luego de realizar los tratamientos propuestos por el diseño central compuesto, fueron examinados mediante el método de cuadrados mínimos.

Se estudió la importancia de los factores: pH y [DTPA], mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia $\alpha = 5\%$. La significancia de cada uno de los coeficientes se determinó mediante un test T además del análisis del p-valor. El análisis de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 6.

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Valor F	p-valor
Modelo	1,8	5	0,4	13,8	0,002
pH	1,2	1	1,2	43,9	0,0003
DTPA	0,2	1	0,2	6,0	0,04
pH²	0,4	1	0,4	16,5	0,005
Residual	0,2	7	0,03		
Falta de Ajuste	0,1	3	0,02	0,7	0,6
Error Puro	0,1	4	0,03		
Cor Total	2,0	12			

Tabla 6: ANOVA de las variables químicas para el modelo cuadrático.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos mediante el ANOVA, se resumen los términos significativos para el modelo matemático que explica la respuesta experimental. Tanto el término cuadrático de la concentración de ligando como la interacción entre ambas variables no se tuvieron en cuenta ya que resultaron no ser significativos ($p\text{-valor} > 0,05$) para el cálculo del modelo.

Se determinó el coeficiente de determinación (R^2), el cual permite evaluar la calidad del ajuste ya que mide la proporción de variabilidad en los datos que es explicada por el modelo. Para este modelo se obtuvo un valor de $R^2 = 0,91$, esto indica que el 91% de la variabilidad de los resultados puede ser explicada por el modelo matemático propuesto. Por otra parte, se determinó también el coeficiente de determinación ajustado (R_{aj}^2), éste se utiliza cuando el modelo está formado por varios términos, puesto que explica la variabilidad del mismo teniendo en cuenta todos éstos. En caso que los términos no contribuyan de manera significativa a la explicación de la respuesta este coeficiente decrece a medida que aumenta el número de este tipo de términos. En general, con fines de predicción en el modelo,

se acepta un R_{aj}^2 mayor a 0,7 [5]. En este caso, el valor obtenido fue de $R_{aj}^2 = 0,81$, lo que demuestra que los términos incluidos en este modelo son significativos.

Una prueba adicional realizada fue la falta de ajuste, ésta verifica la calidad del ajuste del modelo y permite evaluar el orden del modelo. Al haber obtenido, para esta prueba, un p-valor = 0,6 indica que no hay evidencia significativa para rechazar la idea de que el modelo se ajusta de manera adecuada a los datos.

La construcción cuantitativa del modelo relacionando los factores importantes con la respuesta se llevó a cabo mediante un análisis de regresión lineal múltiple. La Ecuación 3 muestra el ajuste polinómico del modelo logrado:

$$I (\mu A) = 15,6 + 5,4 pH - 0,1 [DTPA] + 0,1 pH [DTPA] - 0,4 pH^2 - 0,02 [DTPA]^2 \quad (3)$$

En la Figura 14 se presentan los datos predichos por el modelo en función de los datos experimentales.

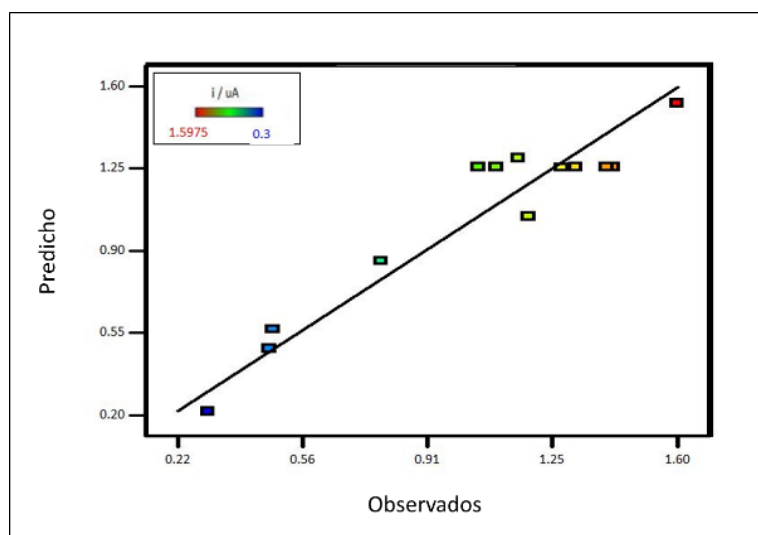


Figura 14: Gráfico de los valores predichos por el modelo vs los valores observados (medidos) utilizando el diseño de DCC.

Como puede observarse en la Figura 14 los datos experimentales se representan mediante símbolos y la línea recta, de pendiente igual a 1 y ordenada al origen de 0, representa a los valores de respuesta que predice el modelo. De la Figura 14 puede concluirse que el modelo matemático ajusta de manera satisfactoria los datos obtenidos experimentalmente, ya que estos últimos se encuentran muy cercanos a la recta.

En la Figura 15 se muestra la variación de la corriente neta en función de las variables químicas. La Figura 15 A presenta la magnitud de la respuesta obtenida respecto a la concentración de ligando, evaluada en los niveles extremos de pH, la línea roja representa la respuesta evaluada a pH = 6,5 mientras que la negra a pH = 5,0. En la Figura 15 B se muestra la superficie de respuesta de la corriente neta en función a las dos variables evaluadas, concentración de ligando y pH. Esta superficie representa el comportamiento de la respuesta predicha por el modelo matemático.

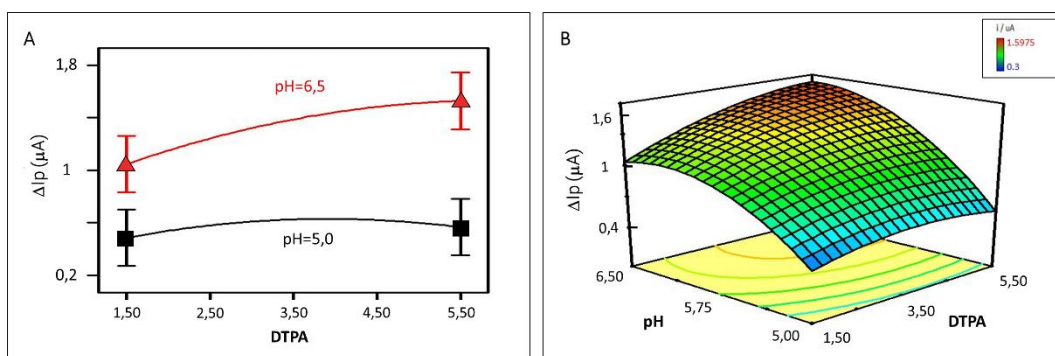


Figura 15: Variación de ΔI_p en función de la concentración de DTPA (A). Superficies de respuesta (B). Los valores experimentales: $K_2Cr_2O_7 = 1 \mu mol L^{-1}$. Los parámetros químicos para la Figura A: $KNO_3 = 0,5 mol L^{-1}$ y $Sol_{Reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$. Los parámetros instrumentales: $E_{ac} = -1 V$, $t_{ac} = 120 s$, $dE = 5 mV$, $E_{SW} = 0,05 V$ y $f = 400 Hz$.

Del gráfico presentado en la Figura 15 A se puede destacar que la corriente se mantiene casi constante cuando se trabaja a pH = 5, para los dos niveles de DTPA.

Sin embargo, los resultados a pH = 6,5 muestran un aumento de la corriente al incrementar la concentración de DTPA. Por otra parte, de la Figura 15 B se puede ver que la señal de corriente utilizada para determinar Cr crece, en valor absoluto, al aumentar el pH y la concentración de ligando, región coloreada en rojo.

En función de los resultados descriptos anteriormente, para maximizar la respuesta analítica, dentro de los intervalos evaluados, es necesario trabajar en los máximos niveles de cada uno de los factores.

La Figura 16 muestra los perfiles de la función deseabilidad para DTPA (A) y pH (B), esta función se utiliza para la obtención de las condiciones óptimas de trabajo. El símbolo color rojo representa el máximo valor de deseabilidad obtenido para ambas variables.

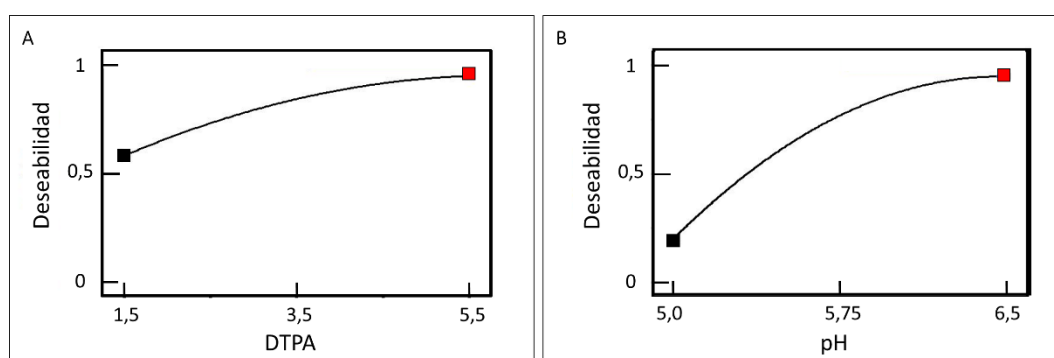


Figura 16: Dependencia de la función deseabilidad respecto a [DTPA] evaluada en un pH = 6,5 (A); y respecto al pH evaluada en una [DTPA] = 5,5 mmol L⁻¹ (B).

El valor máximo obtenido para la función deseabilidad fue de 0,94 al utilizar una concentración de DTPA de 5,5 mmol L⁻¹ y pH = 6,5.

Al comparar los resultados obtenidos mediante la superficie de respuesta con las conclusiones arribadas mediante la función deseabilidad, se obtiene la misma combinación de niveles, de los factores estudiados, para lograr la mejor condición. Esto se debe a que es un estudio una única respuesta mediante dos variables.

Optimización de variables instrumentales

Para determinar cuáles fueron los factores instrumentales importantes de todos los evaluados experimentalmente, se realizó un ANOVA, para el cual se tuvieron en cuenta: f , E_{SW} , dE , t_{ac} y E_{ac} . La Tabla 7 resume la información obtenida mediante este análisis.

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Valor F	p-valor
Modelo	686,4	15	45,8	89,6	< 0,0001
f	58,5	1	58,5	114,6	< 0,0001
dE	29,4	1	29,4	57,5	< 0,0001
E_{SW}	177,5	1	177,5	347,7	< 0,0001
T_{ac}	254,3	1	254,3	498,0	< 0,0001
E_{ac}	0,4	1	0,4	0,8	0,4
f * T_{ac}	9,9	1	9,9	19,3	0,0002
dE * E_{SW}	6,2	1	6,2	12,1	0,002
dE * T_{ac}	1,8	1	1,8	3,6	0,07
E_{SW} * T_{ac}	35,5	1	35,5	69,6	< 0,0001
f²	27,3	1	27,3	53,5	< 0,0001
dE²	8,0	1	8,0	15,6	0,0005
E_{SW}²	27,4	1	27,4	53,8	< 0,0001
T_{ac}²	4,3	1	4,3	8,4	0,007
E_{ac}²	47,5	1	47,5	93,1	< 0,0001
Residual	13,8	27	0,5		
Falta de Ajuste	13,0	23	0,6	3,0	0,1
Error Puro	0,8	4	0,2		
Cor Total	700,2	42			

Tabla 7: ANOVA de las variables instrumentales para el modelo cuadrático.

Como puede verse de la Tabla 7 el modelo utilizado es significativo debido a que el p-valor es menor a 0,05 junto al análisis de la falta de ajuste, la cual presenta un p-valor = 0,1, indicando que es correcto utilizar un modelo cuadrático para el análisis de los datos experimentales.

Se estimó un valor de $R^2 = 0,98$ lo que indica que el modelo tiene en cuenta un 98 % de la variabilidad experimental. Se obtuvo un $R_{aj}^2 = 0,97$, este valor elevado da indicios de que los términos tenidos en cuenta en el modelo son los que realmente tienen influencia en la respuesta, ya que incluir términos irrelevantes disminuye este coeficiente.

Luego de determinar los factores importantes, mediante el análisis de regresión lineal múltiple se construyó el modelo matemático que vincula las variables independientes con la respuesta. La ecuación 4 presenta los coeficientes de cada variable significativa en la respuesta obtenida experimentalmente mediante el diseño de Box-Behnken:

$$\begin{aligned}
 I (\mu A) = & -272,3 + 0,01 f + 254,6 dE + 30,2 E_{SW} - 0,003 t_{ac} - 518,9 E_{ac} + 0,1f E_{SW} \\
 & + 0,0001 f t_{ac} + 5807,02 dE E_{SW} + 3,2 dE t_{ac} + 1,2 E_{SW} t_{ac} \\
 & - 0,00003 f^2 - 45436,2 dE^2 - 912,2 E_{SW}^2 - 0,0002 t_{ac}^2 - 247,9 E_{ac}^2
 \end{aligned} \tag{4}$$

Este modelo matemático incluye solo los términos lineales, cuadráticos e interacciones que tienen efecto significativo sobre la respuesta estudiada.

En la Figura 17 se presentan los datos predichos por el modelo en función de los datos experimentales.

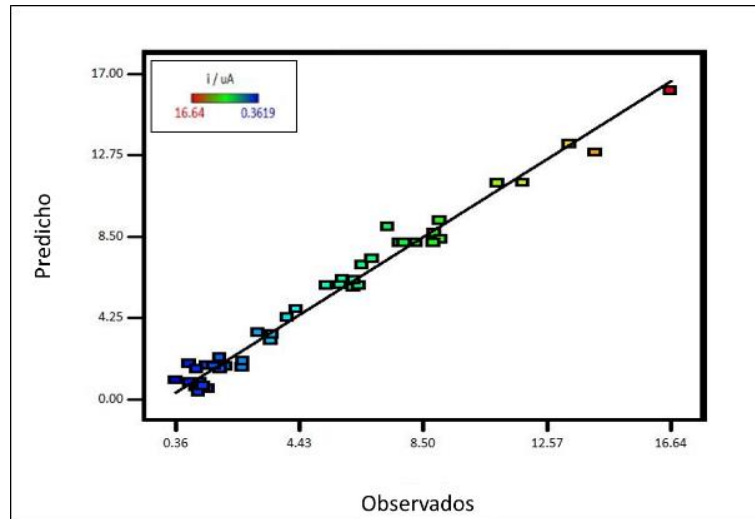


Figura17: Gráfico de los valores predichos por el modelo *vs* los valores observados (medidos) utilizando el diseño de DBB.

En la Figura 17 los datos experimentales se representan mediante símbolos y se encuentran alrededor de una línea de pendiente igual a 1 y ordenada al origen de 0, la que representa cómo deberían ajustar los resultados experimentales con los predichos por el modelo matemático obtenido. De esta Figura puede concluirse que el modelo matemático se ajusta de manera satisfactoria a los datos obtenidos experimentalmente.

En la Figura 18 se muestran dos superficies de respuesta que representan gráficamente el comportamiento de la ΔI_p en función de E_{ac} y dE (Figura 18 A) y respecto a t_{ac} y E_{sw} (Figura 18 B). Las respuestas que se muestran en las superficies corresponden a las ΔI_p predichas por el modelo matemático obtenido.

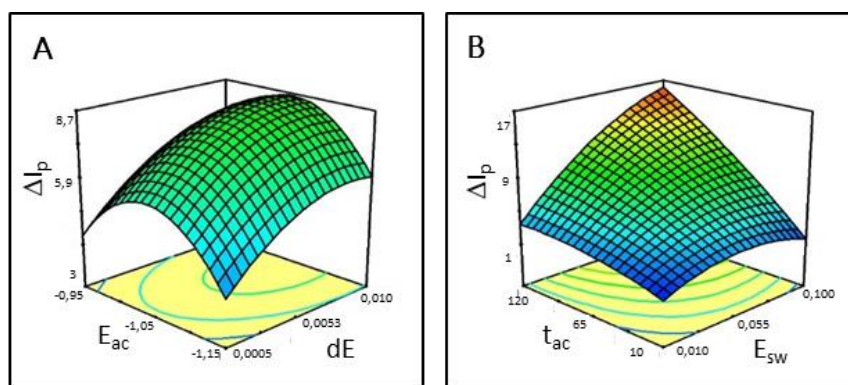


Figura 18: Superficies de respuesta obtenidas en el DBB: (A) E_{ac} - dE y (B) t_{ac} - E_{SW} . Los valores experimentales son medidos para $K_2Cr_2O_7 = 1 \mu mol L^{-1}$. Los parámetros químicos utilizados: $DTPA = 5,5 mmol L^{-1}$, $KNO_3 = 0,5 mol L^{-1}$, $pH = 6,5$ y $Sol_{Reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$. Los parámetros instrumentales para la Figura A: $t_{ac} = 65 s$, $E_{SW} = 0,055 V$ y $f = 255 Hz$ y para la Figura B: $E_{ac} = -1,1 V$, $dE = 5 mV$ y $f = 255 Hz$.

A partir de las superficies de respuestas mostradas en la Figura 18 A se quiere destacar la importancia del término cuadrático para ambas variables. El término E_{ac} presenta un perfil parabólico con las ramas hacia abajo y puede notarse que el término lineal no es significativo, ya que los valores extremos evaluados experimentalmente tienen prácticamente el mismo valor de corriente. El término lineal de la variable dE es significativo, se puede notar en los valores extremos evaluados ya que tienen valores diferentes. Por otra parte, se puede notar de esta superficie de respuesta, que no existe una interacción significativa entre los dos factores (E_{ac} , dE) ya que se mantiene el mismo perfil de respuesta evaluando cada variable en sus puntos extremos.

De la superficie que se muestra en la Figura 18 B se puede observar que, tanto los términos cuadráticos como los lineales son significativos para ambas variables. La interacción entre ambos términos también es significativa, esto se puede notar ya que existe una zona, color rojo, que representa un máximo de respuesta. De ésta puede interpretarse que al trabajar con los valores máximos tanto de t_{ac} como de

E_{sw} se puede conseguir una mayor respuesta de corriente que en otras combinaciones de las mismas.

En la Figura 19 se muestran las diez superficies de respuesta que se logran al representar gráficamente el comportamiento de la ΔI_p en función de dos de los cinco factores instrumentales fijando los tres factores restantes en su valor medio.

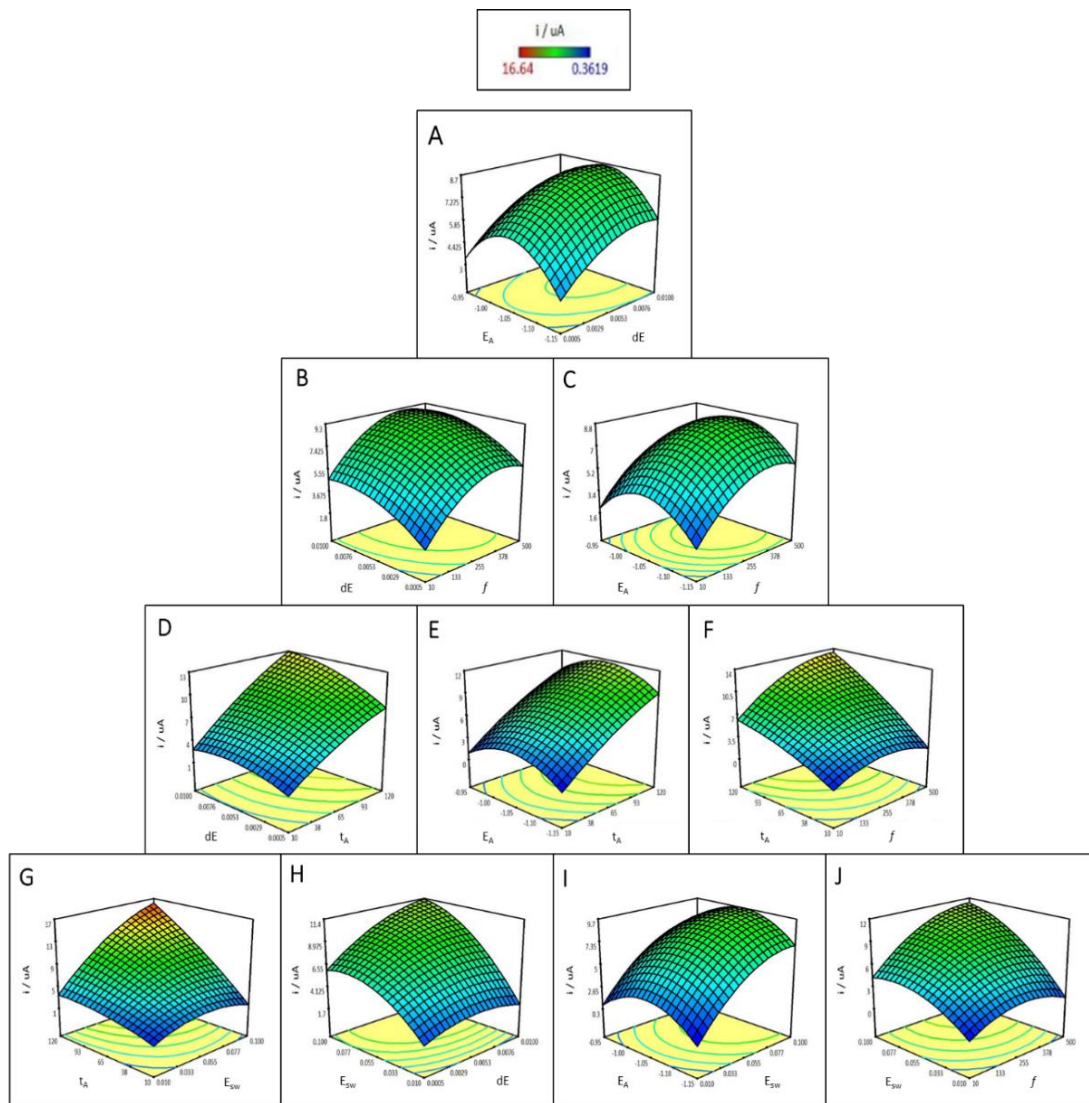


Figura 18: Superficies de respuesta obtenidas en el DBB: (A) E_{ac} - dE ; (B) dE - f ; (C) E_{ac} - f ; (D) dE - t_{ac} ; (E) E_{ac} - t_{ac} ; (F) t_{ac} - f ; (G) t_{ac} - E_{sw} ; (H) E_{sw} - dE ; (I) E_{ac} - E_{sw} ; (J) E_{sw} - f . Todas las superficies se realizaron fijando las otras tres variables en los siguientes valores: $f = 255$ Hz, $dE = 0,0053$ V; $E_{sw} = 0,055$ V; $t_{ac} = 65$ s; $E_{ac} = -1,05$ V. Los valores experimental son medidos para $K_2Cr_2O_7 = 1 \mu mol L^{-1}$ y los parámetros químicos utilizados: $DTPA = 5,5 mmol L^{-1}$, $[KNO_3] = 0,5 mol L^{-1}$, $pH = 6,5$ y $Sol_{reguladora} = 0,5 mol L^{-1}$.

En este caso en particular, si bien se trabajó con una única respuesta (ΔI_p), se estudiaron 5 factores, los que llevan a realizar 10 superficies de respuestas, para interpretar el comportamiento de ΔI_p frente a estas variables. Este número elevado de superficies hace complicado encontrar el valor óptimo de las variables instrumentales a partir de la suma de todos estos gráficos, superponiendo todas las superficies que se muestran en la Figura 19. Por lo que, para la optimización de las variables instrumentales se utilizó la función deseabilidad.

Los perfiles de la función deseabilidad respecto de cada uno de los factores instrumentales se muestra en la Figura 20.

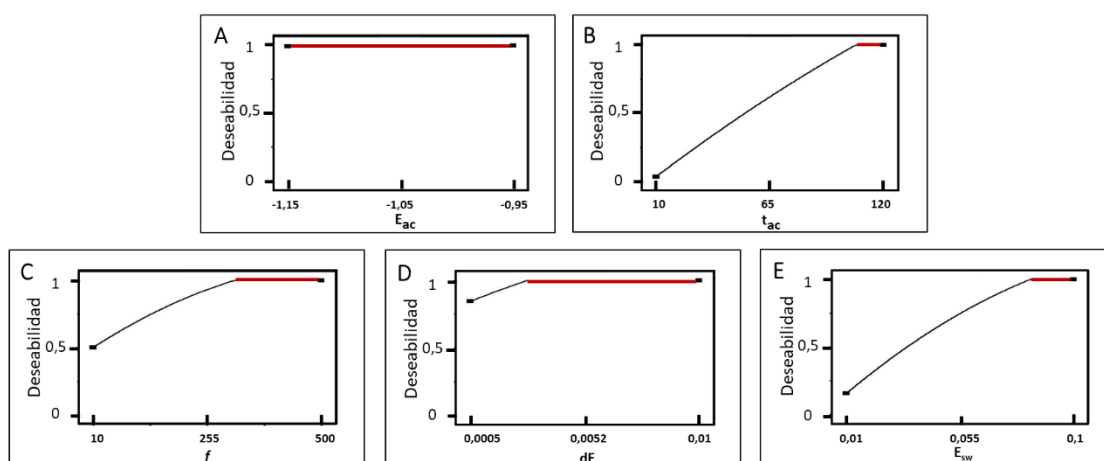


Figura 20: Función Deseabilidad para cada una de las variables instrumentales: (A) Potencial de acumulación; (B) Tiempo de acumulación; (C) frecuencia; (D) Escalón de potencial.

En los perfiles que se muestran en la Figura 20, está representado en línea negra el aumento de la función hasta llegar al valor máximo que se muestra en color rojo. El gráfico A, de la Figura 20, muestra que la función deseabilidad es igual a uno en todo el intervalo para la variable E_{ac} , mientras que para el resto de los factores esta función va incrementando a medida que aumenta el factor hasta alcanzar el valor máximo.

Con el objetivo de encontrar el máximo de respuesta (saturaciones en los perfiles de deseabilidad) se puede conseguir el mismo, mediante distintas combinaciones de las variables, estableciendo de esta manera que el sistema estudiado es un sistema robusto.

De todas las opciones se eligió, para continuar con el trabajo, la combinación de variables que predice una mayor corriente neta de pico (ΔI_p) como respuesta. Estos valores corresponden a los niveles máximos de cada factor: $t_{ac} = 120\text{ s}$, $E_{ac} = -1,1\text{ V}$, $f = 500\text{ Hz}$, $dE = 0,01\text{ V}$ y $E_{SW} = 0,1\text{ V}$.

Cuantificación y especiación en muestras reales y artificiales

La verificación de la linealidad entre la concentración de Cr(VI) y la corriente para el método analítico desarrollado, se realizó preparando tres replicas para cada punto experimental de la curva de calibración.

En la Figura 21 se muestran las curvas de calibración para Cr(VI) determinadas con el método 1 (●) y el método 2 (●).

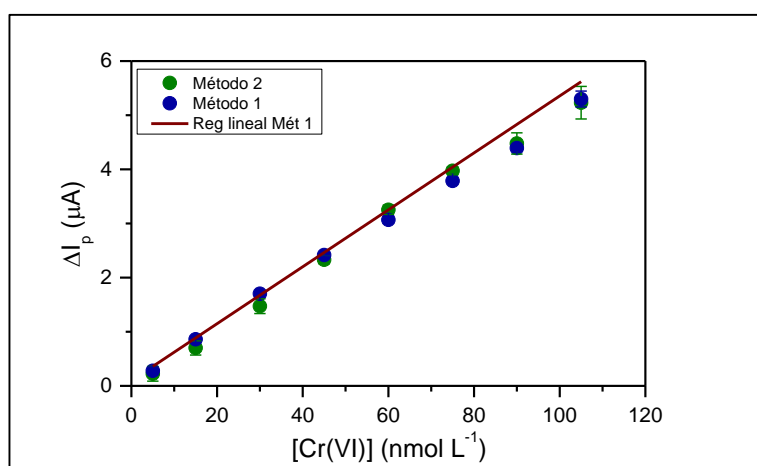


Figura 21: Curva de calibración de Cr(VI). Sin agente oxidante (●) y con agente oxidante (●) $0,2\text{ mmol L}^{-1}$ de $Ce(IV)$. Los parámetros químicos utilizados fueron: $DTPA = 5,5\text{ mmol L}^{-1}$, $KNO_3 = 0,5\text{ mol L}^{-1}$, $pH = 6,5$ y $Sol_{Reguladora} = 0,5\text{ mol L}^{-1}$ y los parámetros instrumentales: $E_{ac} = -1,1\text{ V}$, $t_{ac} = 120\text{ s}$, $dE = 10\text{ mV}$, $E_{SW} = 0,1\text{ V}$ y $f = 500\text{ Hz}$.

Se realizaron ambas curvas de calibración (método 1 y método 2) para estudiar la necesidad de tratar con el agente oxidante a las soluciones con que se realizarían las curvas de calibraciones y la posterior cuantificación de las muestras problemas. Al no existir diferencia significativa entre ambas curvas, se decidió utilizar la del método 1 sin adición del agente oxidante para la cuantificación directa del Cr de las muestras.

La linealidad fue determinada en el intervalo de concentración comprendido entre 5 y 105 nmol L^{-1} . El coeficiente de determinación obtenido mediante el análisis de regresión lineal, fue de $R^2 = 0,998$. El límite de detección obtenido, calculado como 3,3 veces la raíz cuadrada del cuadrado medio del error, es de 3,3 nmol L^{-1} y el de cuantificación de 8,5 nmol L^{-1} , este último fue calculado como 10 veces la raíz cuadrada del cuadrado medio del error.

La ecuación 5 que describe la curva de calibración obtenida para Cr(VI), sin agregado de Ce(IV), es la siguiente:

$$\Delta i (A) = (52 \pm 2) \left(\frac{A}{\text{mol L}^{-1}} \right) \times [\text{Cr}^{6+}] (\text{mol L}^{-1}) + (9 \pm 4) \times 10^{-9} (A) \quad (5)$$

Para corroborar el método desarrollado se decidió comparar el valor de concentración de Cr_{total} determinado por el método 2, con agente oxidante, y el obtenido mediante ICP-MS (técnica utilizada para determinar metales en concentraciones muy bajas).

La muestra a estudiar fue agua de pozo de un tambo instalado en Vicuña Mackenna, al sur de Córdoba. El valor de concentración de Cr_{total} que se determinó mediante ICP-MS fue de $[\text{Cr}]_{total} = 0,617 \pm 0,006 \mu\text{mol L}^{-1}$ y con el método 2 se obtuvo un valor de $[\text{Cr}]_{Total} = 0,61 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$.

El coeficiente de variación entre el valor de concentración obtenido por ICP-MS y el valor obtenido por el método 2 es de 99,3%. Por otra parte, se realizó un test T para

comparación de medias con un 95 % de confianza y se determinó que no hay diferencia significativa entre las concentraciones medidas por ambos métodos, con un p -valor = 0,63. De esta manera se logró validar la técnica planteada para la determinación de Cr_{total} .

La principal ventaja de la metodología desarrollada, cuando se compara con ICP-MS, es que la técnica electroquímica no solo tiene un costo menor de equipamiento, mantenimiento y recursos requeridos, sino que además permite especiar el Cr.

Debido a que la especiación no se puede realizar con ICP-MS, la validación de la metodología desarrollada en este trabajo se realizó mediante la preparación de muestras sintéticas de Cr(VI) y Cr(III) con concentración conocidas y la determinación del porcentaje de recuperación.

La técnica de especiación para ambas especies de Cr, se evaluó mediante muestras sintéticas de concentración de Cr_{total} en un rango entre 45 y 60 $nmol L^{-1}$. Las soluciones fueron preparadas mezclando distintas concentraciones de ambas especies. En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos para el estudio de recuperación, cada uno de los resultados mostrados fue obtenido mediante tres replicas experimentales.

Mezcla	[] Agregada ($nmol L^{-1}$)			[] obtenida ($nmol L^{-1}$)			% Recuperación		
	[Cr III]	[Cr VI]	[CrTotal]	[Cr III]	[Cr VI]	[CrTotal]	[Cr III]	[Cr VI]	[CrTotal]
A	30	30	60	36 ± 1	25 ± 1	61 ± 2	119	83	102
B	15	30	45	15 ± 3	30 ± 6	44 ± 3	100	100	98
C	30	15	45	35 ± 2	14 ± 5	48 ± 5	117	93	109

Tabla 8: Especiación de mezclas sintéticas preparadas diferentes concentraciones de con Cr(VI) y Cr(III)

Se puede observar de la Tabla 8 que a partir del método propuesto los porcentajes de recuperación están comprendidos entre 83% y 119%, esto permite validar la técnica en términos de exactitud para la especiación de Cr. En relación a la precisión, se determinó un coeficiente de variación porcentual entre 4% y 5%, siendo este valor altamente razonable para la cuantificación de este analito.

Debido a los porcentajes tanto de recuperación como de variabilidad obtenidos es que este nuevo método resulta útil como técnica analítica para la detección de las especies de Cr más frecuentes en la naturaleza. Con esta técnica es posible además de la detección y especiación, lograr la cuantificación de las especies en concentraciones tan bajas como $8,5 \text{ nmol L}^{-1}$.

El nivel máximo permitido de Cr en muestras de agua utilizadas para riego agrícola establecidos para la Argentina es de $1,92 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para Cr_{total} . En Canadá, la regulación es más estricta, permitiendo hasta $0,96 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para Cr(III) y $0,094 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para Cr(VI). Teniendo en cuenta esta información y comparando estos valores con el límite de cuantificación de la metodología desarrollada, es destacable que ésta podría ser utilizada para el análisis de muestras contaminadas con el metal en cuestión [16,17].

Conclusiones sobre la aplicación del diseño experimental multifactorial para modelar y optimizar la especiación de Cr inorgánica mediante voltametría de onda cuadrada

Con el fin de responder la pregunta disparadora de este capítulo: ¿Es posible desarrollar una técnica electroanalítica teniendo conciencia ecológica? ¿Es posible producir menor cantidad de residuos químicos? Se desarrolló una técnica electroanalítica para la especiación y cuantificación de Cr(III) y Cr(VI). Para esto se emplearon diseños de experimentos en el proceso de optimización. Esta manera de estudiar y optimizar el sistema es muy prometedora debido a que requiere de un cierto número de experimentos para encontrar las condiciones experimentales que permitan tener la mejor respuesta. En este caso en particular, con 59 experimentos en total, se pudieron determinar las condiciones óptimas de trabajo. La ventaja de esta metodología es, además de economizar en tiempo y en recursos tanto energéticos y humanos disminuye el uso de sustancias químicas. Esto último lleva a producir menor cantidad de residuos químicos, con lo cual se hace un aporte en cuanto a la conciencia ecológica.

Los diseños de superficies de respuestas que se utilizaron fueron DCC y DBB para optimizar y estudiar los efectos individuales e interactivos de los factores tanto de variables químicas (concentración de DTPA y pH de la solución reguladora) como variables instrumentales (frecuencia de SWV, altura de pulso, potencial de pulso y tiempo y potencial de acumulación). Se obtuvieron los modelos polinomiales de segundo orden para predecir la corriente de reducción logrando una descripción muy satisfactoria de los datos experimentales. Esto permitió conocer el comportamiento del sistema y encontrar de manera efectiva las condiciones óptimas de trabajo, consiguiendo una mayor respuesta frente a pequeños cambios de concentración.

Las condiciones óptimas de trabajo fueron: $5,5 \text{ mol L}^{-1}$ para [DTPA], $\text{pH} = 6,5$, $f = 500 \text{ Hz}$, $E_{SW} = 0,1 \text{ V}$, $dE = 0,01 \text{ V}$, $t_a = 120 \text{ s}$ y $E_a = -1,1 \text{ V}$.

La técnica así desarrollada logra límites de detección y cuantificaciones en el orden de unos pocos nmol L^{-1} ($\text{LD} = 3,3 \text{ nmol L}^{-1}$ y $\text{LQ} = 8,5 \text{ nmol L}^{-1}$).

Entre las ventajas que ofrece el método desarrollado en este trabajo, se puede encontrar que el equipamiento, mantenimiento y los recursos requeridos en un equipo electroquímico son mucho más económicos que lo demandado para técnicas híbridas como ICP-MS o AAS, presentando límites de detección comparables. La ventaja más sobresaliente de la técnica electroquímica, en comparación con las empleadas tradicionalmente, es que permite la especiación del Cr en muestras de agua, cuantificando concentraciones muy bajas para ambas especies: Cr(VI) y Cr(III).

Bibliografía

- [1] M. Mäkelä, Energy Convers. Manag. 151 (2017) 630–640.
- [2] S.S. Garud, I.A. Karimi, M. Kraft, Comput. Chem. Eng. 106 (2017) 71–95.
- [3] A. Cuesta, (2010) 23.
- [4] J.M. Pingarron Carrazón, P. Sánchez Batanero, Química Electroanalítica Fundamentos Y Aplicaciones, Primera Ed, Madrid, 1999.
- [5] H. Gutierrez Pulido, R. De la Vara Salazar, Analisis Y Diseño de Experimentos, Segunda Ed, México, 2008.
- [6] J.A. Di Rienzo, F. Casanoves, L.A. Gonzales, E.M. Tablada, M. del P. Díaz, C.W. Robledo, M.G. Balzarini, Estadística Para Las Ciencias Agropecuarias, Quinta Ed, Córdoba, Argentina, 2003.
- [7] G. Figueroa Preciado, Mosaicos Matemáticos 11 (2003) 17–23.
- [8] R. Torres, F. Chacín, J. García, M. Ascanio, Rev. Fac. Agron. 29 (2003) 69–83.
- [9] D.C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, Tercera Ed, Arizona, USA, 1991.
- [10] Y. Li, H. Xue, Anal. Chim. Acta 448 (2001) 121–134.
- [11] R. Bucci, A.L. Magri, A. Napoli, J. Coord. Chem. 24 (1991) 169–175.
- [12] A. Bobrowski, A. Królicka, J. Zarębski, Electroanalysis 21 (2009) 1449–1458.
- [13] M. Boussemart, C.M.G. van den Berg, M. Ghaddaf, Anal. Chim. Acta 262 (1992) 103–115.
- [14] A. Bobrowski, B. Baś, J. Dominik, E. Niewiara, E. Szalińska, D. Vignati, J. Zarębski, Talanta 63 (2004) 1003–1012.

- [15] J. Golimowski, P. Valenta, H.W. Nürnberg, Fresenius Z. Anal. Chem. 322 (1985) 315–322.
- [16] Ministerio de ambiente y desarrollo social, Decreto 831/93: Niveles Guía de Calidad de Agua Para Irrigación, Argentina, 1993.
- [17] Canadian Environmental Quality Guidelines, SUMMARY TABLE - Summary of Existing Canadian Environmental Quality Guidelines, 2003.

Estudio teórico y experimental de voltametría de
redisolución catódica de especies de Cr
inorgánico



Pregunta disparadora

¿Es posible conocer el mecanismo de las reacciones que ocurren con la técnica electroquímica de especiación desarrollada?

Objetivos

Establecer el mecanismo de las reacciones involucradas en la detección de Cr sobre una superficie de mercurio.

Conocer la dependencia general de la corriente en función de las variables instrumentales como la frecuencia y amplitud, en el mecanismo planteado.

Relacionar las dependencias de la corriente en función de las variables instrumentales del mecanismo planteado con los resultados experimentales.

Importancia de los estudios teóricos-experimentales

La mayor parte de la investigación electroquímica pretende interpretar los resultados experimentales a través de herramientas teóricas-computacionales, utilizando el avance tanto de las técnicas instrumentales como de las computacionales. Debido a la conjunción de estas herramientas, es que la resolución teórica de problemas reales contribuye en gran medida al progreso de la ciencia [1].

Entre las áreas en auge que realizan estudios teóricos y computacionales de los sistemas en los que se utilizan como herramienta métodos electroquímicos, se pueden mencionar los modelos de nanoelectrodeposición [2,3], la transferencia de iones a través de una interfaz entre dos soluciones de electrolitos inmiscibles [4,5], el modelado matemático para predecir y optimizar el rendimiento de electrodos enzimáticos y celdas de combustible como una alternativa prometedora a las

fuentes de energía tradicionales [6,7], el modelado matemático de transferencias de cargas heterogéneas en diferentes electrodos, microelectrodos y nanoelectrodos [8–10] y el enlace oro-azufre que está involucrado en el diseño químico de una gran cantidad de electrodos o plataformas modificados para muchas aplicaciones [11,12].

Otra área que involucra estudios experimentales y teóricos se enfoca en el campo electroanalítico destinado a la cuantificación de la disponibilidad de metales esenciales y tóxicos tanto para plantas y animales, como para la salud humana. Este estudio involucra analizar interconversiones cinéticas, procesos de transporte e implica resolver ecuaciones relacionadas con las reacciones, como las de transferencia de carga, intercambio del ligando y la difusión de varias especies metálicas para describir la especiación de un dado metal. Esta área de la electroanalítica resulta de gran interés debido a que proporciona criterios cuantitativos sobre la biodisponibilidad y labilidad de metales [13,14].

Redisolución catódica catalítica: cuantificación de Cr en solución

Como se mencionó anteriormente, existen varias técnicas de especiación electroquímica para el Cr, sin embargo la más utilizada, que fue descrita a mediados de la década de los ochenta y se utiliza hasta la actualidad, se basa en la estrategia de redisolución catódica catalítica acoplada con técnicas muy sensibles, como lo son la voltametría de pulso diferencial (DPV) o de onda cuadrada (SWV) [15,16].

Las técnicas de redisolución están basadas en la preconcentración, mediante la adsorción de un analito dado, y la posterior redisolución desde el electrodo mediante el empleo de una técnica voltamperométrica [17].

Durante el proceso de redisolución catódico, el sistema electroquímico, puede estar acoplado a un proceso catalítico. Es por ello que la redisolución catódica catalítica proporciona gran sensibilidad en la determinación cuantitativa de elementos trazas [16,18–20]. Esto se debe a que no sólo se realiza la acumulación de la especie de interés en la superficie del electrodo, durante la etapa de preconcentración sino también a la presencia del ciclo catalítico que aumenta aún más la señal analítica.

Esta técnica electroquímica utilizada para la determinación de niveles trazas de Cr, requiere de un agente complejante, DTPA, de la presencia de iones nitrato ($(NO_3)^-$) y un medio relativamente ácido.

Se considera que la acumulación se debe a la adsorción del complejo $Cr(III) - DTPA$ sobre la superficie del electrodo de trabajo y el ciclo catalítico ocurre por la presencia de $(NO_3)^-$ en solución [21]. Los detalles experimentales de esta técnica han sido presentados en profundidad en el capítulo "Aplicación del diseño experimental multifactorial para modelar y optimizar la especiación de Cr inorgánico mediante SWV".

Debido a que la respuesta electroquímica depende de variables como: pH, relación de concentración entre Cr y DTPA, potencial y tiempo de acumulación, entre otros, resulta de gran importancia realizar un estudio de distribución de especies en función del pH.

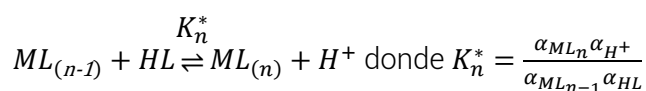
En la Tabla 1 se informan los valores del logaritmo de las constantes de estabilidad globales β para los equilibrios sucesivos de protonación para el ligando (DTPA), el complejo $(Cr(III) - DTPA)$ y la formación de los hidróxi-complejos de Cr(III) [22,23].

	Log β		Log β		Log β
HDTPA ⁴⁻	10,5	[Cr(DTPA)(H ₂ O)] ²⁻	22	(Cr(OH)) ⁺²	9,2
H ₂ DTPA ³⁻	19,1	[Cr(HDTPA)(H ₂ O)] ⁻	28,2	(Cr(OH) ₂) ⁺	16,8
H ₃ DTPA ²⁻	23,4	[Cr(H ₂ DTPA)(H ₂ O)]	34	Cr(OH) ₃	22
H ₄ DTPA ⁻	26,1	[Cr(H ₃ DTPA)(H ₂ O)] ⁺	32,5	(Cr(OH) ₄) ⁻	26,9
H ₅ DTPA	28,1				
H ₆ DTPA ⁺	29,7				
H ₇ DTPA ³⁺	30,4				
H ₈ DTPA ²⁺	30,3				

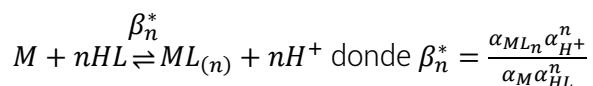
Tabla 1: Valores de Log β para protonación de DTPA y $Cr^{3+} - DTPA$ y formación de hidróxi-complejos de Cr(III) [22,23].

La constante de estabilidad β es el producto de las constantes de formación para los sucesivos equilibrios de formación de complejo. A continuación, se plantea de manera general el equilibrio de formación de un complejo a un pH particular:

La formación en pasos sucesivos:



La reacción global:



Las constantes reales de estabilidad se calculan:

$$K_n = K_n^* K_{H1} \text{ y } \beta_n = \beta_n^* K_{H1}^n \text{ donde } K_{H1} \text{ es la constante de hidrólisis del ligando.}$$

Los primeros cinco valores de β de protonación del ligando que se muestran en la Tabla 1, corresponden a la unión de H^+ con los carboxilatos y los últimos tres al enlace con los grupos aminos.

El DTPA es un ligando pentadentado, el cual deja libre de la coordinación un grupo iminodiacético. Para completar el índice de coordinación de seis que presenta el $Cr(III)$, en bibliografía se propone que una molécula de agua se encontraría enlazada al ion metálico. La relación estequiométrica del complejo metal-ligando es 1:1 [22].

La Figura 1 muestra la estereoquímica del complejo $Cr(III) - DTPA$ en solución acuosa a $pH \cong 7$, valor en el cual el ligando se encontraría completamente deprotonado [22].

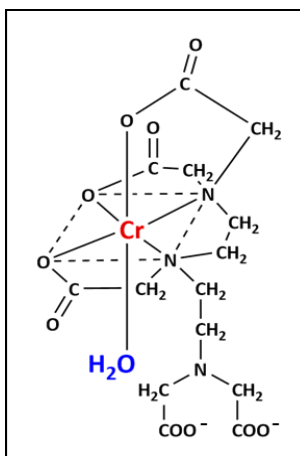


Figura 1: Estereoquímica del complejo $Cr(III) - DTPA$ a $pH \cong 7$. Figura tomada de "Chromium (III) complexes with diethylentriaminepentaacetic acid". R. Bucci et al. Journal of coordination chemistry. 1991; 24:2;169-175 [22].

Los diagramas de distribución de especies de DTPA en función de pH se muestran en la Figura 2 A, mientras que en la Figura 2 B se analiza además cómo varían las especies del complejo $Cr(III) - DTPA$ cuando se consideran las constantes de la Tabla 1 para concentraciones de $[DTPA] = 5,5 \text{ mmol L}^{-1}$ y de $[Cr] = 0,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

En la Figura 2 B se puede observar que el Cr ligado al DTPA forma cuatro especies diferentes en soluciones acuosas. A $\text{pH} = 3$ existen en iguales proporciones el complejo monoprotonado con el diprotonado, a pH menores que éste comenzaría a formarse la especie con tres portones. En el intervalo de pH entre 4,5 y 8,5 existen en equilibrio el complejo monoprotonado con el totalmente deprotonado.

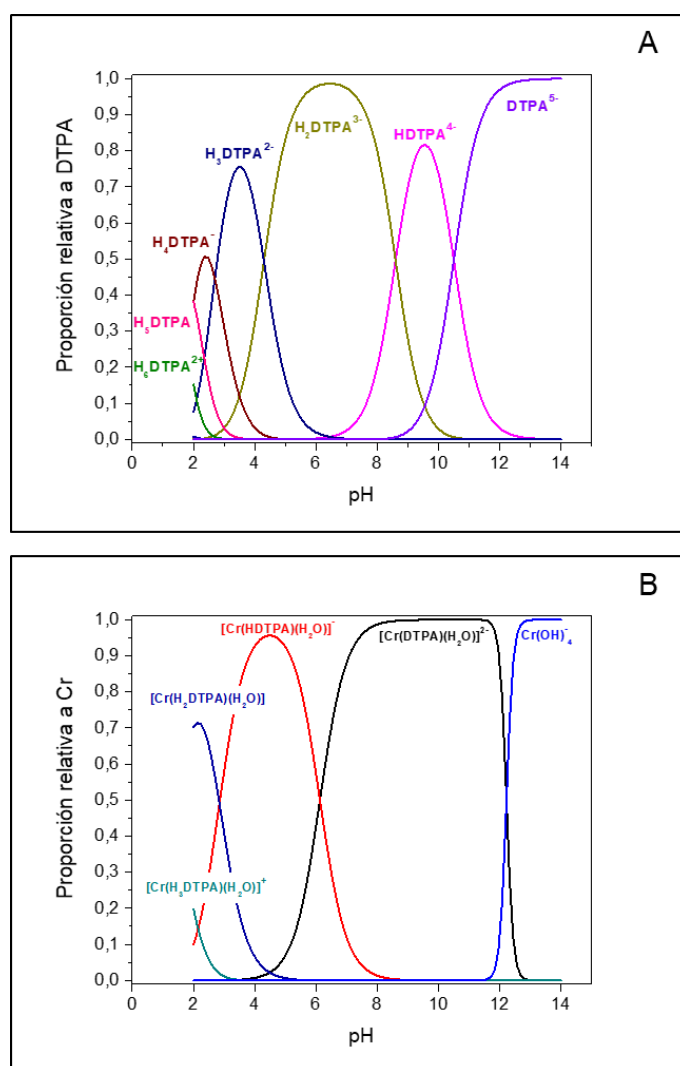


Figura 2: Diagrama de distribución de especies: (A) DTPA ; (B) Cr(III) – DTPA, calculado para $[\text{DTPA}] = 5,5 \text{ mmol L}^{-1}$ y $[\text{Cr}] = 0,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ con el programa HYSS (Hyperquad simulation and speciation)

Es importante remarcar en este punto que, a $\text{pH}=6$, valor en que se realizaron todos los experimentos de este capítulo, están en equilibrio el complejo

completamente deprotonado $[\text{Cr}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ con el monoprotonado $[\text{Cr}(\text{HDTPA})(\text{H}_2\text{O})]^-$.

Materiales y métodos

Reactivos químicos y soluciones

Todas las soluciones, diluciones y blancos se prepararon con agua ultra-pura (18 MΩcm) obtenida con un sistema MilliQ de Millipore. Las soluciones reguladoras de pH fueron preparadas con ácido acético/ acetato de sodio en una concentración 2 mol L^{-1} y se les ajustó el valor de pH con HCl (Cicarelli) o KOH (Anedra), éste fue controlado antes de cada experimento con un pH-metro con electrodo de vidrio (Mettler Toledo).

Las soluciones de KNO_3 3 mol L^{-1} fueron preparadas exclusivamente con drogas de calidad analítica (Sigma o J. T. Baker). El ligando, ácido dietilentriaminopentaacético DTPA (Sigma) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ se preparó con la cantidad necesaria de reactivo y, agregándole un 25 % de amoníaco (Suprapur®, Merck) hasta superar $\text{pH} > 6$ para lograr disolverlo completamente.

La solución stock de Cr(VI) se preparó disolviendo $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Cicarelli), las pruebas experimentales se realizaron a pH 4, 5 y 6, mostrándose solo los resultados obtenidos para el último valor.

Equipamiento

Las medidas electroquímicas se realizaron con un equipo Autolab (Eco-Chemie, Utrecht, Netherlands), los potenciostatos utilizados fueron PSTAT 20 y PGSTAT101

equipados con los softwares GPES 4.3 y NOVA 1.9 para el manejo de los equipos respectivamente.

Programa de simulación

Los programas de simulación y ajuste se realizaron en lenguaje FORTRAN utilizando el Compilador FORTRAN integrado al paquete Microsoft Visual Studio 2008 Professional Edition.

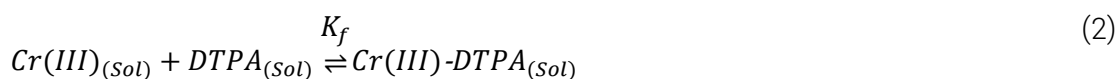
Resultados y discusión

Mecanismo de reacción: catalítico tipo 1

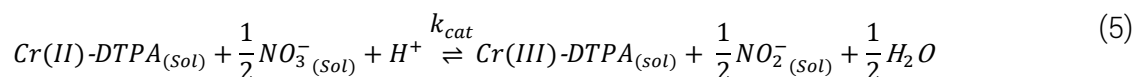
En el esquema 1 se muestra el conjunto de reacciones que explican el mecanismo de reducción del complejo $Cr(III) - DTPA$ propuesto en bibliografía. En este esquema se presentan las reacciones tanto para el proceso de acumulación como para el de redisolución. Para este conjunto de reacciones se tiene en cuenta un mecanismo de reacción catalítico E-C' (electroquímico seguido por catálisis química).

Esquema 1

Proceso de acumulación, aplicando potenciales entre $-1,2 \text{ V} < E < -1,1 \text{ V}$:



Etapa de redisolución catódica catalítica, con un barrido de potencial desde -1,2 V hasta -1,5 V:



La Figura 3 muestra de manera esquematizada el mecanismo antes mencionado.

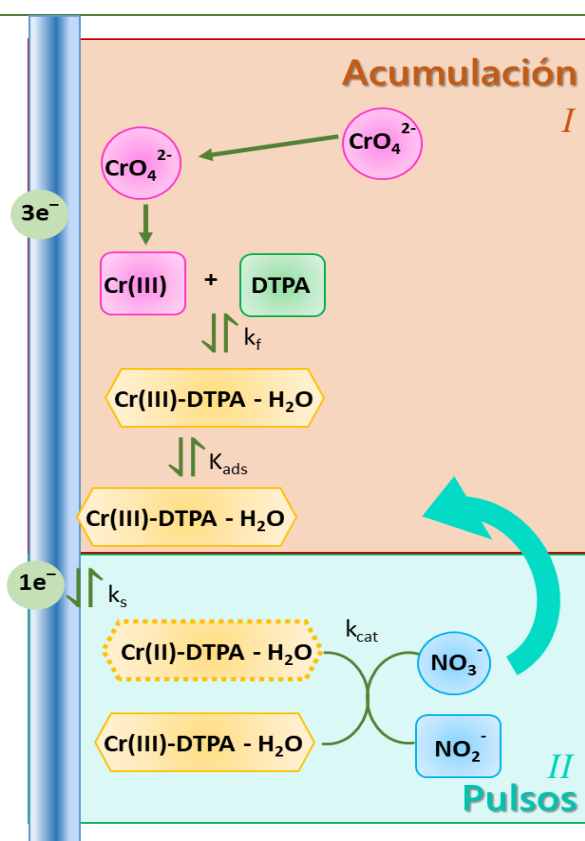


Figura 3: Esquema del mecanismo catalítico tipo 1 para la detección electroquímica de Cr en presencia de DTPA y NO_3^- .

El recuadro *I* representa el proceso que tiene lugar en la cercanía del electrodo durante la etapa de acumulación del analito, al aplicar -1,1 V. El recuadro *II* resume los procesos que ocurren durante la redisolución catódica, que en este caso corresponde a la secuencia de pulsos de SWV que van desde -1,2 V hasta -1,5 V.

Durante la etapa de preconcentración, la especie de Cr(VI) se reduce a Cr(III), que en presencia del ligando forma el complejo $Cr(III) - DTPA$. Una vez formado este compuesto, se adsorbe en la superficie del electrodo.

Al aplicar los pulsos de onda cuadrada, el ion Cr(III) se reduciría a Cr(II) involucrando un electrón en la etapa de transferencia electrónica. La presencia de iones NO_3^- da lugar a una reacción muy rápida, donde éste se reduce a NO_2^- , proveyendo los electrones necesarios para la re-oxidación del Cr(II) a Cr(III) y cerrando de esta manera un ciclo catalítico [21].

El mecanismo presentado es considerado como un mecanismo catalítico de primer tipo [24] y la manera general de esquematizarlo es la siguiente:



Donde la especie O corresponde a Cr(III)-DTPA, R a Cr(II)-DTPA y el catalizador Y el NO_3^- .

Comparación entre el comportamiento experimental y el estudio teórico

La Figura 4 muestra los valores de corriente directa (I_d) e inversa (I_r) en verde y azul respectivamente, del mecanismo propuesto anteriormente. La Figura A corresponde a las corrientes simuladas para un mecanismo E-C' tipo 1 y la Figura B a los datos obtenidos experimentalmente. Todas las corrientes fueron normalizadas para facilitar la comparación.

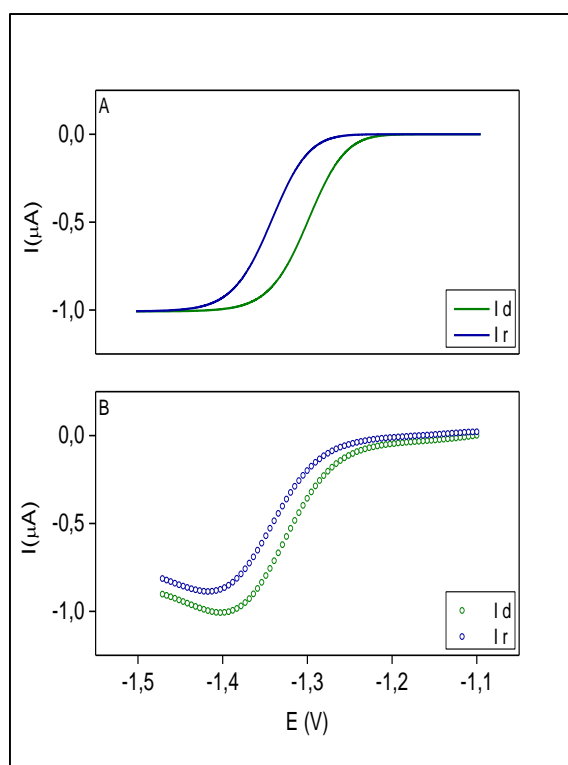


Figura 4: Respuesta de corriente en función de potencial para el barrido de redisolución mediante SWV, corriente directa I_d (—) e I_r (—). (A) Curvas teóricas (—) para un mecanismo catalítico tipo 1 y (B) curvas experimentales (○) obtenidas en las siguientes condiciones experimentales: $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \mu M$, $DTPA = 5 mM$, $KNO_3 = 0,1 M$ y $pH = 6$ determinadas con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 30 s$, $E_{SW} = 50 mV$, $dE = 5 mV$ y $f = 100 Hz$.

Como puede observarse en la Figura 4, los valores de corriente obtenidos de manera teórica, en el gráfico A, presentan una forma sigmoidea, tanto para la corriente directa como para la inversa. Sin embargo, las curvas experimentales (Figura 4 B) muestran una caída de corriente para valores de potencial más negativos. Cuando se superponen los perfiles de I_d e I_r de ambos procesos para compararlos, lo cual no se muestra gráficamente, se observa que el proceso experimental difiere de las curvas simuladas, indicando que existe algún/os proceso/s no considerado por el mecanismo propuesto en bibliografía [15].

El estudio mecanístico requiere conocer el número de electrones involucrados (n) en la etapa de transferencia de carga. Para ello se evaluó n considerando la transferencia de 1, 2 y 3 electrones respectivamente, de acuerdo al mecanismo propuesto. Estos valores fueron obtenidos considerando algunos posibles procesos: para $n = 1$ la reducción de Cr(III) a Cr(II) , con $n = 2$ se podría considerar la reducción de NO_3^- a NO_2^- o la reducción de Cr(III) a Cr(0) para $n = 3$.

En la Figura 5 se muestran los voltagramas simulados para los distintos valores de n considerados. Se presentan los valores de corriente obtenidos al simular la respuesta para la transferencia de 1, 2 y 3 electrones, en verde, bordó y azul, respectivamente, mientras que los círculos corresponden a la corriente neta obtenida experimentalmente.

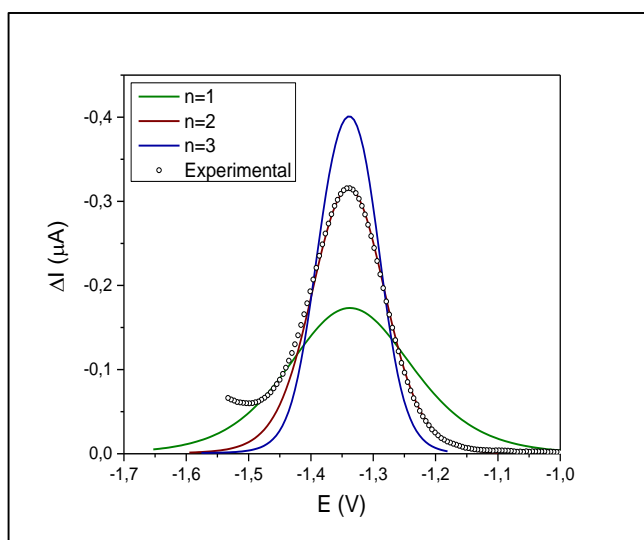


Figura 5: Corriente neta simulada en función del potencial para distintos valores de número de electrones (n) de la etapa electroquímica: 1 en verde, 2 bordó y 3 en color azul. Calculada suponiendo $k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, $k_{chem} = 1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E^o = -1,098 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$. El voltograma experimental (○) obtenido en las siguientes condiciones $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = 0,15 \text{ } \mu\text{M}$, $\text{DTPA} = 5 \text{ mM}$, $\text{KNO}_3 = 0,1 \text{ M}$ y $\text{pH} = 6$ determinadas con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $E_{sw} = 50 \text{ mV}$, $dE = 5 \text{ mV}$ y $f = 100 \text{ Hz}$.

A partir de la Figura 5 es posible comparar ambos resultados, teóricos y experimentales, y determinar que la transferencia de carga involucra 2 electrones debido a la coincidencia entre ambas respuestas de corriente.

Teniendo en cuenta esta información y la diferencia encontrada al comparar la forma de los voltogramas experimentales con los teóricos, es que motivaron a un estudio más profundo del mecanismo de reacción. Otro motivo para proponer un nuevo mecanismo se debe a que, en las condiciones experimentales, es poco probable que el ion nitrato actúe como agente oxidante.

El nuevo análisis se basó principalmente en proponer un mecanismo, diferente a la catálisis tipo 1. El cual, acoplado al proceso electroquímico que ocurre en la etapa de preconcentrado, produce el efecto observado experimentalmente.

Mecanismo de reacción: catalítico tipo 2 sin adsorción

Los resultados presentados anteriormente indican que es necesario plantear nuevos mecanismos para lograr explicar los resultados obtenidos experimentalmente. En bibliografía se han planteado otras propuestas de mecanismos catalíticos con un esquema de reacción diferente al tipo 1, los que se han utilizado para describir sistemas como Co^{3+}/Co^{2+} y V^{3+}/V^{2+} en presencia de NO_2^- [25]. A estos mecanismos se los conoce como sistema catalítico de tipo 2 y de manera general se lo esquematiza en dos etapas:

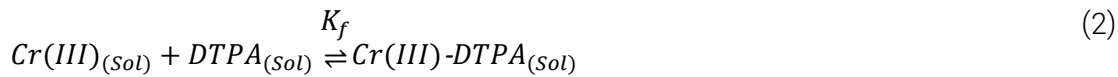


A pesar que el mecanismo planteado no tiene en cuenta la adsorción del complejo durante la redisolución, el mismo fue empleado para estudiar los procesos químicos y electroquímicos que ocurren al utilizar la técnica electroanalítica desarrollada en este trabajo doctoral.

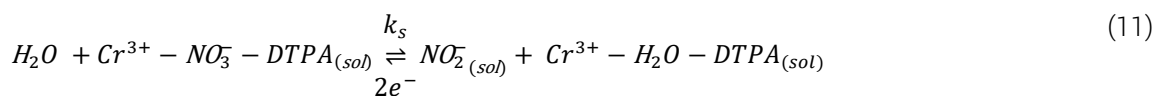
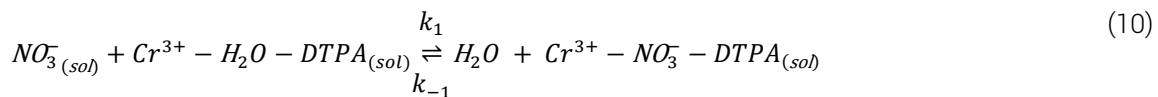
La primera etapa del sistema catalítico tipo 2, corresponde a un proceso químico mientras que en la segunda ocurre el proceso electroquímico. Teniendo en cuenta esto es que se propone un nuevo modelo, lo más simplificado posible, para explicar el mecanismo de detección electroquímica de Cr en presencia de DTPA.

Esquema 2

Al igual que en el mecanismo tipo 1 propuesto por bibliografía [15], el proceso de acumulación o de preconcentración ocurriría al aplicar potenciales entre $-1,2 \text{ V} < E < -1,1 \text{ V}$:



La diferencia se encuentra en la etapa de redisolución catódica catalítica, con un barrido de potencial desde E: $-1,2 \text{ V}$ hasta $-1,5 \text{ V}$:



De manera esquemática la Figura 6 muestra los procesos que se plantean para las vecindades del electrodo.

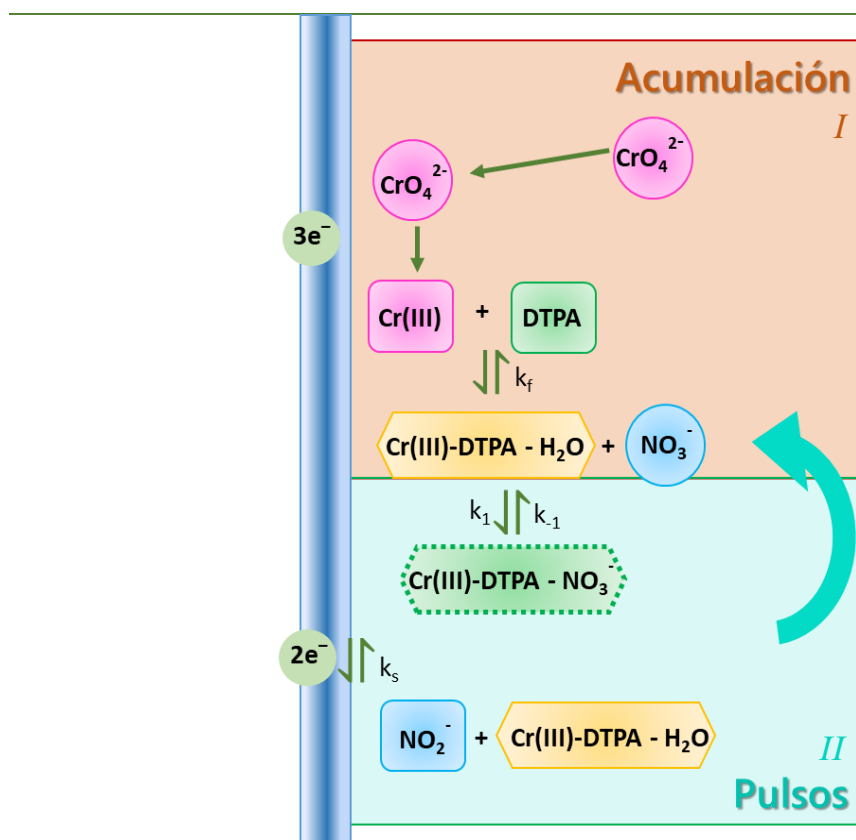


Figura 6: Mecanismo catalítico tipo 2 sin adsorción para la detección electroquímica de Cr en presencia de DTPA y NO_3^- .

El recuadro *I* representa el proceso que tiene lugar durante la etapa de acumulación al aplicar -1,1 V o -1,2 V y el recuadro *II* resume el proceso que se postula para la etapa de redisolución mediante un barrido de SWV desde -1,2 V hasta -1,5 V.

Como se mencionó anteriormente en la etapa de preconcentración, la especie de Cr(VI) se reduce a Cr(III) (reacción 1) y en presencia del ligando forma el complejo $\text{Cr(III)} - \text{DTPA}$ (reacción 2) que se adsorbe en la superficie del electrodo (reacción 3).

En la etapa de redisolución, se considera que el equilibrio del complejo esta desplazado hacia la especie en solución, dando lugar al sistema catalítico tipo 2. Una vez formado este compuesto soluble, se intercambia una molécula de agua por un ion nitrato formando de esta manera la especie electroactiva en solución (reacción 10). En la cercanía del electrodo se transfieren dos electrones, reduciendo el NO_3^- a NO_2^- (reacción 11). A continuación el ion nitrito se desacopla del complejo y así comenzaría el ciclo catalítico propuesto, donde el complejo $\text{Cr(III)} - \text{DTPA}$ se comportaría como catalizador.

El intercambio de la molécula de agua por el ion nitrato y viceversa para los procesos que se postulan en la cercanía del electrodo se muestra en la Figura 7. En principio, el complejo serviría para acercar el nitrato a la superficie del electrodo, o bien haría de puente entre el nitrato y el electrodo durante la transferencia electrónica.

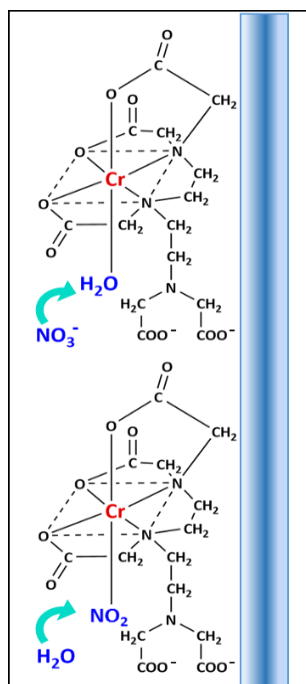


Figura 7: Estereoquímica del complejo $\text{Cr(III)} - \text{DTPA}$: intercambio de la molécula de agua por el ion nitrato y viceversa

Modelo matemático

El modelo matemático que se propone para simular la respuesta obtenida mediante voltametría de onda cuadrada tiene en cuenta las condiciones experimentales utilizadas para estudiar el mecanismo de reacción. Una de las condiciones más importantes es la concentración de los iones nitrato ya que, al trabajar con varios órdenes de magnitud superior a la del complejo electroactivo se puede considerar constante, simplificando de esta manera el sistema:



Donde la especie O corresponde a NO_3^- , R a NO_3^- y el intermediario P es el complejo $Cr(III) - NO_3^- - DTPA$.

Los equilibrios planteados en las ecuaciones 12 y 13 corresponden a un mecanismo de reacción simple: Químico-Electroquímico (CE) [26]. Donde k_1 y k_{-1} son constantes de velocidad de pseudo-primer orden, $K = \frac{k_1}{k_{-1}}$ es la constante de equilibrio para la formación de la especie P , y k_s es la constante de velocidad para la transferencia de carga [27,28].

Los cambios de concentración de las especies involucradas en función del tiempo se analizaron considerando la difusión de las especies unidimensionalmente al plantear la segunda ley de Fick se obtienen las siguientes ecuaciones diferenciales [26–28]:

$$\frac{\partial C_O}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_O}{\partial x^2} - k_1 [C_O - C_P K^{-1}] \quad (14)$$

$$\frac{\partial C_P}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_P}{\partial x^2} + k_1 [C_O - C_P K^{-1}] \quad (15)$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_R}{\partial x^2} \quad (16)$$

Para este estudio mecanístico se utiliza un coeficiente de difusión de $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para las tres ecuaciones anteriores, con la intención de simplificar el análisis. En el apéndice que se muestra al finalizar el capítulo, se presenta la lista de símbolos y abreviaturas usadas a lo largo del texto.

Las condiciones de contornos consideradas se muestran a continuación:

$$\underline{t = 0, x \geq 0:} \quad C_O + C_P = C^*; \quad C_O C_P^{-1} = K \quad (17)$$

$$C_R = 0 \quad (18)$$

$$\underline{t > 0, x \rightarrow \infty:} \quad C_O + C_P \rightarrow C^*; \quad C_O C_P^{-1} \rightarrow K \quad (19)$$

$$C_R \rightarrow 0 \quad (20)$$

$$\underline{t > 0, x = 0:} \quad D \left(\frac{\partial C_O}{\partial x} \right)_{x=0} = 0 \quad (21)$$

$$D \left(\frac{\partial C_P}{\partial x} \right)_{x=0} = - \frac{I}{nFA} \quad (22)$$

$$D \left(\frac{\partial C_R}{\partial x} \right)_{x=0} = \frac{I}{nFA} \quad (23)$$

$$\frac{I(t)}{nFA} = -k_s \exp[-\alpha \varphi(t)] \{ (C_O)_{x=0} - (C_R)_{x=0} \exp[\varphi(t)] \} \quad (24)$$

$$\varphi(t) = \frac{nF [E(t) - E^\circ]}{RT} \quad (25)$$

De acuerdo a lo propuesto anteriormente, se considera positiva la corriente de oxidación, por lo que la de reducción, es negativa. El parámetro A corresponde al área del electrodo, E(t) es la función de potencial de onda cuadrada, E° es el potencial estándar de la reacción de óxido-reducción, I la corriente, n el número de electrones involucrados en la transferencia de carga, F la constante de Faraday y α el coeficiente de transferencia de carga. Para obtener la función corriente Ψ(t), es necesario normalizar la corriente (I) de la siguiente manera:

$$\Psi(t) = I(t) \pi^{1/2} [nFSc^*(fD)^{1/2}]^{-1} \quad (26)$$

Donde f es la frecuencia de la onda cuadrada.

Para resolver las ecuaciones diferenciales planteadas con la 2º ley de Fick, es conveniente hacer el siguiente cambio de variables [27]:

$$\phi = C_O + C_P \quad (27)$$

$$\theta = (C_O - C_P K^{-1})^{tk_{chem}} \quad (28)$$

La constante de velocidad de acumulación para la reacción química acoplada es

$$k_{chem} = k_1 + k_{-1}.$$

Debido a este cambio de variables es que se obtiene el siguiente conjunto de ecuaciones nuevo:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} \right) \quad (29)$$

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} \right) \quad (30)$$

$$D \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)_{x=0} = - \frac{I}{nFA} \quad (31)$$

$$D \left(\frac{\partial \theta}{\partial x} \right)_{x=0} = I \exp(k_{chem}t) (nFAK)^{-1} \quad (32)$$

Una vez integradas las ecuaciones anteriores la expresión para la corriente resulta ser:

$$\psi_{(m)} = \{ \lambda \mathfrak{z} + \mathfrak{z} \Xi_{b(m)} + T \Xi_{a(m)} \} [-\mathfrak{N}_{(m)} - \mathfrak{z} Q_1 - T_{(m)}]^{-1} \quad (33)$$

Las expresiones involucradas en cada paso de la integración numérica, se presentan a continuación:

$$\mathfrak{z} = K(K + 1)^{-1} \quad \mathfrak{x}_{(m)} = \mu^{[\alpha\varphi(m)]} \quad \Xi_{a(m)} = \sum_{j=1}^{m-1} \Psi_{(j)} S_{(i)}$$

$$\Xi_{b(m)} = \sum_{j=1}^{m-1} \Psi_{(j)} Q_{(i)} \quad S_{(i)} = (i)^{1/2} - (i - 1)^{1/2} \quad i = m - j + 1$$

$$Q_{(i)} = \{S_{(i)} + \gamma Y_{(i)}\} \quad Y_{(i)} = \operatorname{erf}[(k_{chem} \delta i)^{1/2}] - \operatorname{erf}[(k_{chem} \delta (i - 1))^{1/2}]$$

$$\lambda = \pi \left(\frac{q}{2}\right)^{1/2} \quad T_{(m)} = 1^{\varphi(m)} \quad \gamma = \left[\frac{\pi}{k_{chem}\delta}\right]^{1/2} (2K)^{-1}$$

$$\mu = \left[\frac{D\pi}{\delta}\right]^{1/2} (2k_s)^{-1} \quad \delta = (qf)^{-1}$$

El término q representa el número de sub-intervalos considerados en cada onda, para todos los cálculos realizados se empleó un valor de $q = 50$.

Los cálculos se realizaron con los siguientes parámetros:

$$k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}, \quad k_{chem} = 1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}, \quad K = 0,01, \quad \alpha = 0,40, \quad n = 2, \quad C^* = 0,3 \mu\text{M}, \quad E^o = -1,098 \text{ V}, \quad D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}, \quad A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2.$$

Comparación entre el comportamiento experimental y el estudio teórico

Es importante poder comparar las ecuaciones matemáticas que representan al proceso CE con lo obtenido experimentalmente para corroborar los resultados y asegurarse de esta manera si es correcto el modelo propuesto.

En la Figura 8 se muestran los perfiles de corriente directa e inversa en función del potencial para el sistema planteado. Se presentan la I_d en verde y la I_r en azul. En la Figura 8 A se muestran los perfiles teóricos, calculados según el mecanismo

catalítico tipo 2, mientras que en la Figura 8 B se presentan los resultados experimentales. Finalmente, en la Figura 8 C puede observarse la superposición de ambos resultados. Los voltagramas experimentales de la Figura 8 han sido divididos por $f^{1/2}$, para lograr compararlos con los simulados. Todas las corrientes fueron normalizadas para facilitar la comparación.

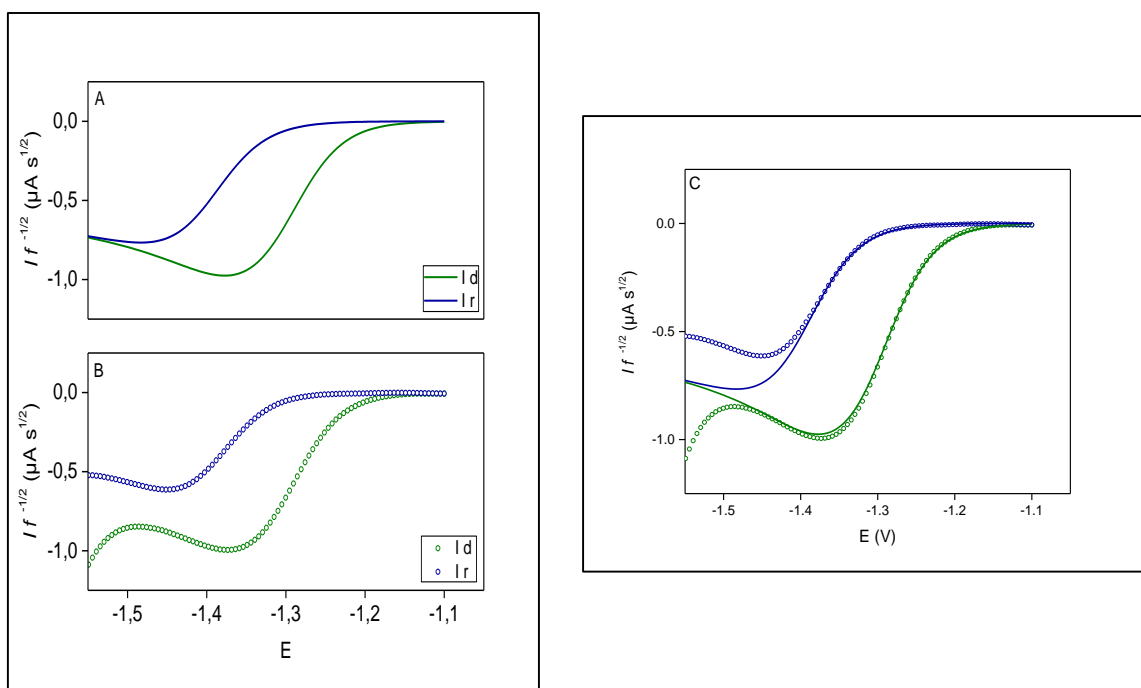


Figura 8: Respuesta de corriente en función de potencial para el barrido de redisolución mediante SWV, corriente directa I_d (—) e I_r (—). (A) resultados teóricos para mecanismo tipo 2, (B) resultados experimentales y (C) superposición de los perfiles de corriente simulados (—) y experimentales (●). Los resultados teóricos se calcularon con la Ec. (33), para $k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, $k_{chem} = 1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E^o = -1,098 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \mu M$, $DTPA = 5 \text{ mM}$, $KNO_3 = 0,1 \text{ M}$ y $pH = 6$ determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $E_{SW} = 50 \text{ mV}$, $dE = 5 \text{ mV}$ y $f = 100 \text{ Hz}$

A partir de la Figura 8 se puede notar que el proceso de reducción ocurre en el intervalo de potenciales desde -1,2 V hasta -1,5 V, puesto que en estos potenciales aparece el pico de reducción en la I_d . Debido a la forma de las curvas voltamétricas

puede deducirse una transferencia de carga lenta, ya que I_r no presenta pico de oxidación, este efecto es más notorio al aumentar f , porque al aumentar la velocidad con la que se lleva a cabo la voltampería, el pico que presenta I_d es cada vez menos notorio, como consecuencia la corriente neta disminuye. Este decaimiento en la corriente se muestra gráficamente en el apartado siguiente.

Al comparar en el mismo gráfico la respuesta experimental y simulada (Figura 8 C), puede notarse que coinciden aceptablemente las respuestas. Para lograr ajustar las curvas experimentales respecto a las simuladas, se utilizó el mismo factor de escala con un valor muy cercano a $3 \times 10^{-7} \text{ A s}^{1/2}$, este factor tiene en cuenta información como: la superficie del electrodo, la concentración del analito en el seno de la solución y el coeficiente de difusión. Es importante destacar que, con el mismo factor, se lograron ajustar todas las curvas presentadas en este capítulo.

Estudio sobre la dependencia de la corriente respecto la frecuencia

Para analizar el comportamiento cinético del sistema en estudio mediante SWV es necesario modificar dos parámetros de la técnica: la frecuencia (f) y la amplitud (E_{sw}). Usualmente, el parámetro f es el más utilizado ya que produce cambios en la escala de tiempo, y por lo tanto, también cambios en la cinética aparente de los experimentos [29].

La Figura 9 muestra los valores de corriente neta normalizadas por la raíz cuadrada de la frecuencia en función del potencial, para distintos valores de frecuencia (A) 25 Hz, (B) 75 Hz y (C) 200 Hz. Las líneas llenas azules representan las curvas teóricas mientras que los círculos vacíos, las experimentales.

En la Figura 9 se puede observar la forma de campana simétrica que presenta la corriente neta simulada para el conjunto de valores de frecuencia estudiados. Para

lograr la comparación entre las curvas teóricas y experimentales, es necesario dividir por $f^{1/2}$ a los perfiles voltamétricos experimentales y así poder mostrar la coincidencia entre ambas, esto se debe a que la función corriente (corriente del mecanismo simulado) está normalizada por dicho factor.

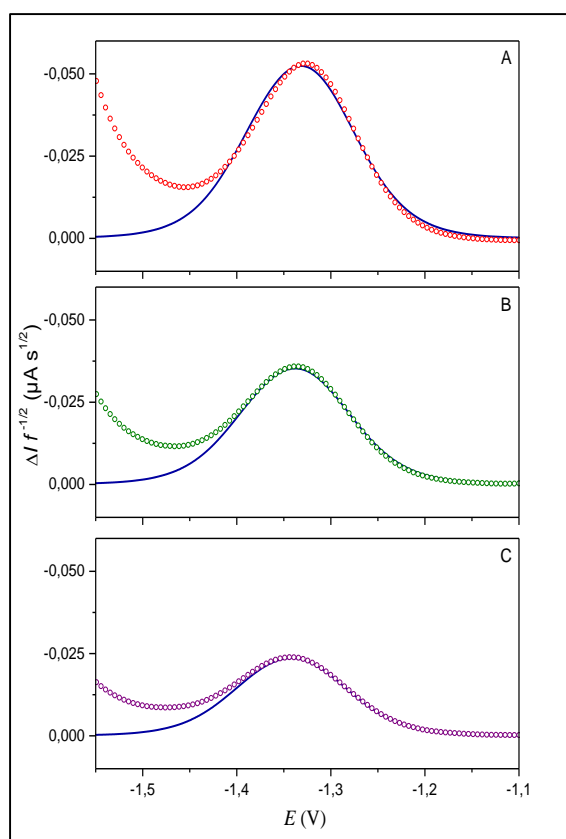


Figura 9: Dependencia de la corriente neta en función al potencial, curvas experimentales (●) y simulada (—) para distintos valores de frecuencia de (A) 25 Hz, (B) 75 Hz y (C) 200 Hz. Los resultados teóricos se calcularon con la Ec. (33), para $k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, $k_{chem} = 1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E^o = -1,098 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son $K_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = 0,15 \text{ } \mu\text{M}$, $\text{DTPA} = 5 \text{ mM}$, $\text{KNO}_3 = 0,1 \text{ M}$ y $\text{pH} = 6$ determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $E_{SW} = 50 \text{ mV}$ y $dE = 5 \text{ mV}$.

Es notable de la Figura 9 la disminución de la respuesta con el aumento de la frecuencia tanto para la curva experimental como para la teórica, como se planteó anteriormente, esto podría corresponder a una transferencia de carga lenta, lo que

concuerta con lo predicho por bibliografía para reacciones cuasi-reversibles con una reacción química rápida [28].

En la Figura 10 se muestra la dependencia de la corriente de pico normalizada por $f^{1/2}$ (A) y el potencial de pico (B) en función de la frecuencia de barrido. En línea llena azul se presenta la respuesta teórica, mientras que los círculos verdes corresponden a los resultados experimentales.

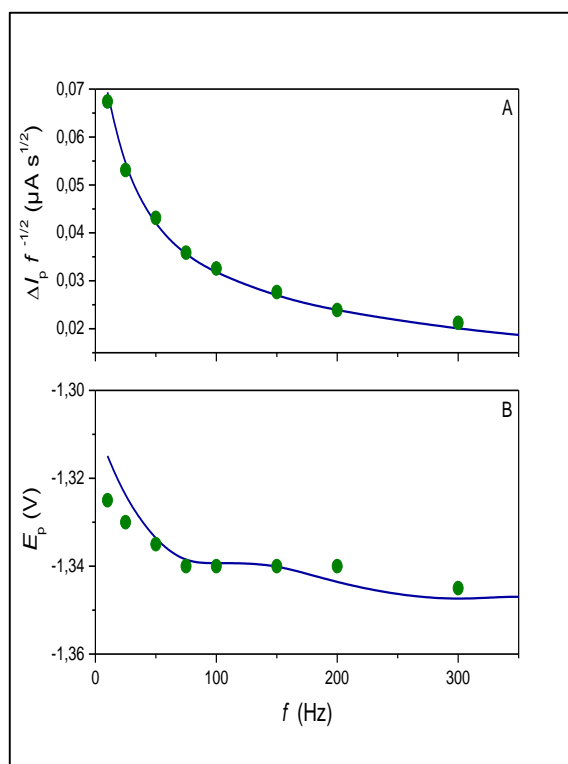


Figura 10: Dependencia de (A) $\Delta I_p f^{-1/2}$ y (B) E_p en función de la frecuencia para resultados teóricos (—) y experimentales (●). Los resultados teóricos se calcularon con la Ec. (33), para $k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, $k_{chem} = 1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E^o = -1,098 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \mu M$, $DTPA = 5 \text{ mM}$, $KNO_3 = 0,1 \text{ M}$ y $pH = 6$ determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ y $dE = 5 \text{ mV}$.

Como puede observarse de la Figura 10 existe una gran coincidencia en el comportamiento tanto para $\Delta I_p f^{-1/2}$ como E_p en función de f entre los resultados teóricos y experimentales.

Puede notarse una dependencia compleja entre el E_p y f , además de que para valores bajos de frecuencia no existe un buen ajuste entre lo teórico y lo experimental. Esta dependencia compleja ha sido descrita en bibliografía y resulta del efecto en conjunto de la cinética química y electroquímica [28].

Estudio sobre la dependencia de la corriente respecto de la amplitud

Otro parámetro para modificar y así estudiar el comportamiento cinético del sistema es la amplitud (E_{sw}). El análisis del efecto que produce este parámetro en el mecanismo de reacción se llevó a cabo manteniendo constante las otras variables.

En la Figura 11 se muestran las corrientes netas para la reacción de reducción de Cr(III) en función del potencial, para distintas amplitudes: (A) 10 mV, (B) 75mV y (C) 150 mV. Las líneas llenas azules representan la respuesta teórica y los círculos vacíos, las experimentales.

En los gráficos de la Figura 11, es notable la forma de campana simétrica que se obtiene tanto para la corriente simulada como para la experimental, para amplitudes bajas. No obstante, a medida que E_{sw} aumenta, esta campana se ensancha y su simetría se va perdiendo parcialmente.

Como puede verse en la Figura 11 la coincidencia de las respuestas experimentales con las teóricas es aceptable a amplitudes baja, pero a medida que se incrementa este valor la coincidencia es cada vez menor, ya que sólo se observa un ajuste conveniente en el intervalo de potenciales entre -1,1 y -1,3 V.

En el barrido experimental, de la Figura 11 C, se observa un proceso secundario cuya señal comienza a -1,4 V, éste se superpone al proceso principal y podría deberse a la reducción de hidrógeno. Este proceso faradaico está fuera de la ventana de potencial de barrido, pero el pulso de la onda directa puede registrarlo debido a la

gran amplitud (150 mV) que se utiliza en este caso particular del análisis mecanístico.

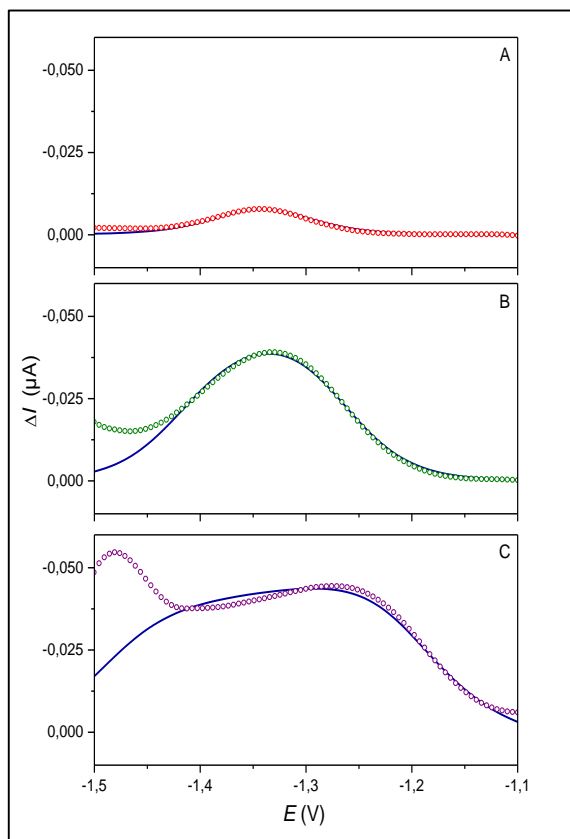


Figura 11: Corriente neta experimental (○) y simulada (—) en función del potencial para valores de amplitud de (A) 10 mV, (B) 75 mV y (C) 150 mV. Los resultados teóricos se calcularon con la Ec. (33), para $k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, $k_{chem} = 1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E^0 = -1,098 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \text{ } \mu\text{M}$, $DTPA = 5 \text{ mM}$, $KNO_3 = 0,1 \text{ M}$ y $pH = 6$ determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $dE = 5 \text{ mV}$ y $f = 100 \text{ Hz}$.

La Figura 12 muestra las variaciones de la corriente de pico normalizada por la amplitud (A) y el potencial de pico (B) respecto a la amplitud para ambas situaciones. Los círculos verdes muestran la respuesta experimental mientras que en línea llena azul el cálculo teórico.

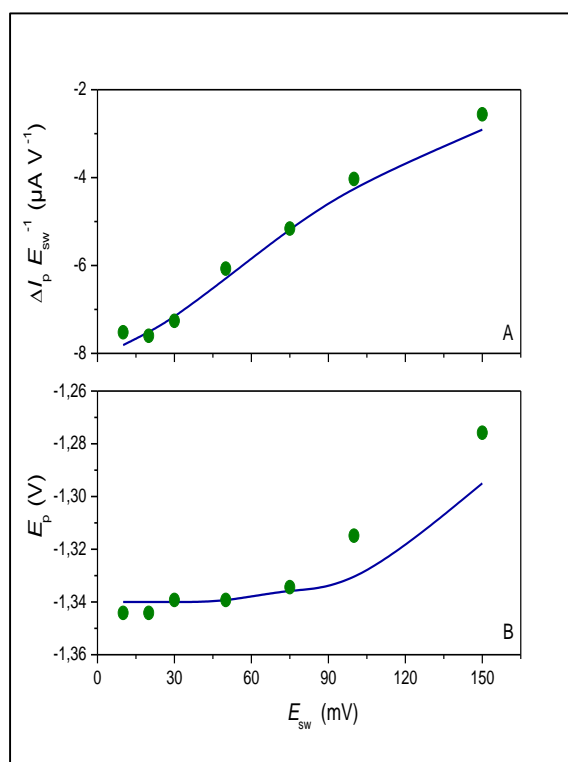


Figura 12: Dependencia de (A) $\Delta I_p f^{-1/2}$ y (B) E_p en función del potencial para resultados teóricos (—) y experimentales (●). Los resultados teóricos se calcularon con la Ec. (33), para $k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, $k_{chem} = 1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E^o = -1,098 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son $K_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = 0,15 \text{ } \mu\text{M}$, $\text{DTPA} = 5 \text{ mM}$, $\text{KNO}_3 = 0,1 \text{ M}$ y $\text{pH} = 6$ determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $dE = 5 \text{ mV}$ y $f = 100 \text{ Hz}$.

Nuevamente es de destacar en la Figura 12, que existe una gran coincidencia en el comportamiento tanto para los valores de $\Delta I_p E_{SW}^{-1}$ como para E_p en función a E_{SW} entre los resultados teóricos y experimentales.

En la Figura 12 B puede verse que la coincidencia de las respuestas experimentales con las teóricas es aceptable a amplitudes baja, pero a medida que se incrementa este valor la coincidencia es cada vez menor, ya que a amplitudes mayores a 80 mV se observa una diferencia entre E_p experimental con los teóricos de unos 20 mV. Esta diferencia podría deberse al efecto de la reducción de hidrogeno ya

que está introduciendo algún tipo de error al analizar estos parámetros, haciendo que los potenciales de pico se desplacen hacia valores menos negativos.

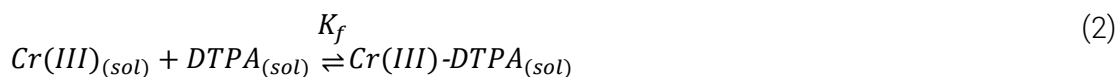
Mecanismo de reacción: catalítico tipo 2 con adsorción

El mecanismo propuesto hasta el momento, si bien tiene un buen ajuste con la respuesta experimental y las tendencias generales, no deja de ser una aproximación bastante simplificada de la realidad ya que hay un proceso que todavía no se ha considerado: el de adsorción del complejo $Cr(III) - DTPA$.

Al igual que en el sistema catalítico tipo 2 sin adsorción, durante la descripción del mecanismo existe siempre una etapa de preconcentración donde no solo se reduce CrO_4^{2-} a $Cr(III)$, sino que además hay una etapa de acumulación sobre la superficie del electrodo, donde probablemente aumenta la concentración del complejo $Cr(III) - DTPA$ en la superficie del electrodo, esta acumulación involucra la adsorción, del complejo formado, en la superficie. La diferencia del sistema sin adsorción con el que se plantea en este apartado radica en la etapa de redisolución, donde el proceso planteado corresponde a un mecanismo catalítico tipo 2 pero modificado.

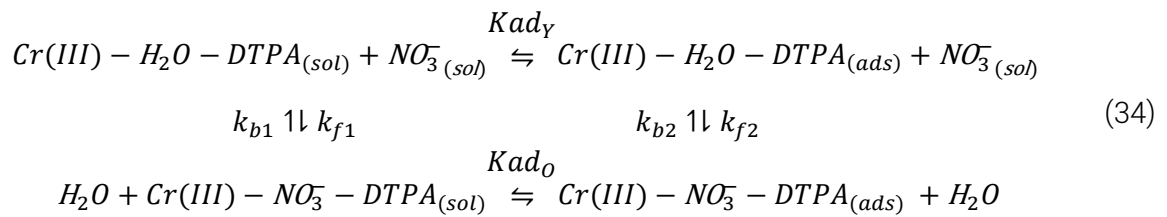
Esquema 3

Durante la etapa de acumulación a potenciales entre $-1,2\text{ V} < E < -1,1\text{ V}$, al igual que en los mecanismos anteriores, ocurriría la adsorción del complejo además de los siguientes procesos:

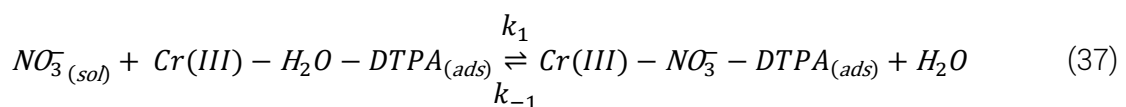
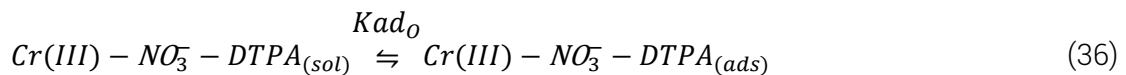
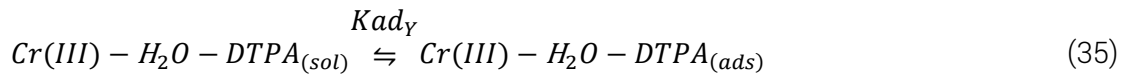




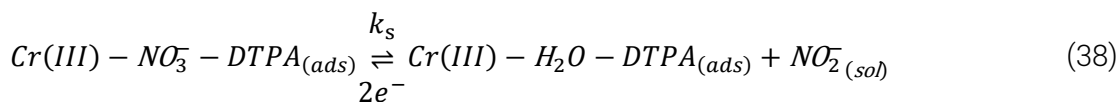
En presencia de nitrato, la ecuación (3) puede representarse por una expresión que contemple el intercambio que mantendría el complejo Cr(III)-DTPA con moléculas de agua y iones nitrato. Este intercambio puede representarse mediante la siguiente ecuación:



Donde las constantes k_f y k_b indican la incorporación y salida de nitrato en el complejo de Cr(III), mientras que los índices 1 y 2 indican si se trata de la especie en solución y adsorbida del complejo. Además, las constantes K_{ad_O} y K_{ad_Y} indican si se trata de la adsorción del complejo con o sin nitrato, respectivamente. Si se considera que las etapas de adsorción son reversibles, este sistema también podría expresarse mediante el siguiente conjunto de ecuaciones:



Donde las constantes k_1 y k_{-1} representan las constantes de velocidad global de formación y ruptura de la especie que se considera electroactiva, $Cr(III) - NO_3^- - DTPA$. A partir de estas consideraciones, cuando se efectúa el barrido de potencial entre -1,2 V y -1,5 V ocurre la siguiente reacción:



Si bien las ecuaciones 37 y 38 constituyen un mecanismo C-E, en presencia de exceso de ión nitrato el producto adsorbido puede regenerar al complejo electroactivo oxidado, y de esta forma la expresión también sería equivalente a la de un proceso catalítico.

La Figura 13 muestra de manera esquemática los procesos que ocurrirían en las vecindades del electrodo para este mecanismo. Donde el recuadro *I* representa el proceso que tiene lugar durante la etapa de acumulación y adsorción del analito en la cercanía del electrodo y el recuadro *II* resume los procesos ocurridos durante los pulsos de potenciales aplicados con SWV. En la Figura 13 puede notarse lo que ocurriría durante el proceso de preconcentración en el recuadro *I*. En una primera etapa la especie de Cr(VI) se reduce a Cr(III) (reacción 1) y en presencia del ligando se forma el complejo $Cr(III) - DTPA$ (reacción 2). Una vez formado, este compuesto se adsorbe en la superficie del electrodo de trabajo (reacción 3). A continuación, recuadro *II*, el ion nitrato se acopla al complejo adsorbido sobre la superficie del electrodo, liberando una molécula de agua y de esta manera se formaría la especie electroactiva (reacción 37), esta es la etapa en la que difiere este mecanismo con el planteado en el apartado anterior. Cuando inicia el barrido negativo de potencial ocurre la transferencia de los dos electrones involucrados en la reducción de NO_3^- a NO_2^- . Éste último se desacopla del complejo, dando lugar al comienzo de un ciclo

catalítico en el que $Cr(III) - DTPA$ se comporta como catalizador (reacciones 37 y 38).

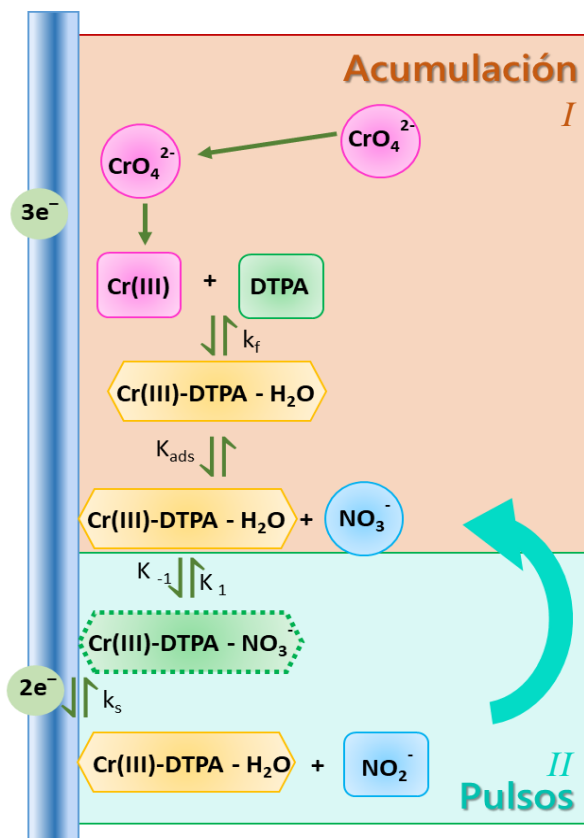


Figura 13: Esquema del mecanismo catalítico tipo 2 con adsorción para la detección electroquímica de Cr en presencia de DTPA y NO_3^- .

Modelo matemático

El modelo teórico utilizado para simular la respuesta de corriente obtenida mediante voltametría de onda cuadrada, considera un proceso electroquímico cuasi-reversible acoplado a una reacción química catalítica en la cual el reactivo se adsorbe en la superficie del electrodo y el producto es liberado a la solución.

El reactivo adsorbido se encuentra en equilibrio con su especie soluble, este comportamiento se encuentra generalmente en la detección de trazas metálicas mediante acumulación adsorptiva [24].

Una manera simplificada de expresar el mecanismo de reacción que ocurre en las cercanías del electrodo se presenta en la ecuación 39:



Si se tiene en cuenta que la especie P representa al ión nitrato que se encuentra en exceso, se puede considerar que su gradiente de concentración no cambia en la superficie del electrodo ($x = 0$), lo que permite reescribir la ecuación 39 como una ecuación de primer orden. Además, si se incorporan los equilibrios de adsorción de especies y la etapa electroquímica, se obtiene la secuencia de reacciones 40 – 43 que representaría el esquema de reacción que ese analiza:



Donde k_1 y k_{-1} son constantes de velocidad de pseudo-primer orden, $K = \frac{k_1}{k_{-1}}$ es la constante de equilibrio para la formación de la especie O , y k_s es la constante de velocidad para la reacción de transferencia de carga [27,28]. Las constantes k_1 , k_{-1} , K_{ad} y K son parámetros cinéticos y termodinámicos, los cuales se obtienen a partir de los ajustes teóricos de las respuestas experimentales.

Utilizando la segunda ley de Fick se obtienen las ecuaciones diferenciales (44, 45 y 16) que permiten estudiar los cambios de concentración de las especies involucradas en función del tiempo:

$$\frac{\partial C_Y}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_Y}{\partial x^2} - k_1 [C_Y - C_O K^{-1}] \quad (44)$$

$$\frac{\partial C_O}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_O}{\partial x^2} + k_1 [C_Y - C_O K^{-1}] \quad (45)$$

$$\frac{\partial C_r}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_r}{\partial x^2} \quad (16)$$

Para simplificar el estudio se utiliza $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ como coeficiente de difusión para todas las especies involucradas en las ecuaciones diferenciales.

Las ecuaciones 46-57 muestran las condiciones de contornos consideradas, teniendo en cuenta que la especie Y está en exceso lo que permite suponer que su concentración no cambia significativamente durante los experimentos:

$$\underline{t = 0, x \geq 0:} \quad C_O + C_Y = C_O^* + C_Y^* = C^* \quad (46)$$

$$C_O C_Y^{-1} = C_O^* C_Y^{*-1} = K \quad (47)$$

$$C_R = C_R^* = 0 \quad (48)$$

$$\underline{t > 0, x \rightarrow \infty:} \quad C_O + C_Y \rightarrow C^* \quad (49)$$

$$C_O C_Y^{-1} \rightarrow K \quad (50)$$

$$C_R \rightarrow 0 \quad (51)$$

$$\underline{t > 0, x = 0:} \quad D \left(\frac{\partial C_Y}{\partial x} \right)_{x=0} = 0 \quad (52)$$

$$D \left(\frac{\partial C_O}{\partial x} \right)_{x=0} = \frac{I}{nFA} + \frac{\partial \Gamma_o}{\partial t} \quad (53)$$

$$D \left(\frac{\partial C_R}{\partial x} \right)_{x=0} = - \frac{I}{nFA} \quad (54)$$

$$\frac{I(t)}{nFA} = k_s \exp[-\alpha \varphi(t)] \{ \Gamma_o - (c_r)_{x=0} r_s \exp[\varphi(t)] \} \quad (55)$$

$$\Gamma_o = K_{ad}(c_o)_{x=0} \quad (56)$$

$$\varphi(t) = \frac{nF [E(t) - E_{ad}^0]}{RT} \quad (57)$$

Los parámetros utilizados se representan con las mismas letras que en el modelo anterior y en el apéndice se muestra la lista de los símbolos y abreviaciones utilizadas en este capítulo. La diferencia con el modelo anterior es que la corriente catódica se considera como positiva.

Para normalizar la corriente, se utiliza la siguiente ecuación 58:

$$\Psi(t) = I(t)[nFA\Gamma_0 f]^{-1} \quad (58)$$

Donde f es la frecuencia de la onda cuadrada.

Para resolver las ecuaciones diferenciales planteadas con anterioridad se tienen en cuenta las condiciones de contorno relevantes y se utilizan transformadas de Laplace. Sin embargo, antes de comenzar con la resolución es preciso hacer el cambio de variables [27] para poder trabajar en el dominio de Laplace, el que se muestra en las ecuaciones 59 y 60:

$$\phi = c_y + c_o \quad (59)$$

$$\theta = (c_y - \frac{c_o}{K}) \exp[kt] \quad (60)$$

Luego del cambio de variables se obtiene un nuevo conjunto de ecuaciones (29, 30, 61 y 62) en función a ϕ y θ :

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} \right) \quad (29)$$

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} \right) \quad (30)$$

$$D \left(\frac{\partial \phi}{\partial t} \right)_{x=0} = \frac{I}{nFA} + \frac{\partial \Gamma_{\phi}}{\partial t} \quad (61)$$

$$D \left(\frac{\partial \theta}{\partial t} \right)_{x=0} = -I \exp[kt] (nFAK)^{-1} + \frac{\partial \Gamma_{\theta}}{\partial t} - k\Gamma_{\theta} \quad (62)$$

Una vez integradas las ecuaciones anteriores se llega a la expresión para la función corriente que se presenta en la ecuación 63:

$$\Psi_{(m)} = \{\beta - \Xi_{(m)}\} \{\exp[\alpha \varphi_{(m)}] a^2 (\gamma k_s)^{-1} + \Xi_{(1)}\}^{-1} \quad (63)$$

Donde:

$$\begin{aligned} a &= D^{1/2} (K_{ad})^{-1} & K &= k_1/k_{-1} & k &= k_1 + k_{-1} \\ \gamma &= K(K+1)^{-1} & \beta &= a^2 f^{-1} & \xi &= [-a + (a^2 + 4k)^{1/2}] 2^{-1} \\ \omega &= [-a - (a^2 + 4k)^{1/2}] 2^{-1} & & & z &= \omega^2 - k \\ y &= \xi^2 - k & i &= m - j + 1 & \aleph &= a(K(\omega - \xi))^{-1} \\ \lambda &= 2a(\delta/\pi)^{1/2} & \delta &= (qf)^{-1} & & \end{aligned}$$

De los parámetros incluidos en las ecuaciones, es importante destacar que a y β son adimensionales y corresponden a funciones auxiliares relacionadas con la adsorción.

Las expresiones involucradas en cada paso de la integración numérica se muestran a continuación:

$$\Xi_{(m)} = \sum_{j=1}^{m-1} \Psi_{(j)} \left\{ \left[\lambda \mathbb{S}_{(i)} (1 + \exp[\varphi_{(m)}] (\gamma K_{ad})^{-1}) + \aleph_{a(i)} + \aleph [\aleph_{z(i)} + \mathbb{Q}_{z(i)} - \aleph_{y(i)} - \mathbb{Q}_{y(i)} + \mathbb{T}_{(i)}] \right] \right\}$$

$$\Xi_{(1)} = \left[\lambda (1 + \exp[\varphi_{(1)}] (\gamma K_{ad})^{-1}) + \aleph_{a(1)} + \aleph [\aleph_{z(1)} + \mathbb{Q}_{z(1)} - \aleph_{y(1)} - \mathbb{Q}_{y(1)} + \mathbb{T}_{(1)}] \right]$$

$$\mathbb{S}_{(i)} = (i)^{1/2} - (i-1)^{1/2}$$

$$\aleph_{a(i)} = \exp[a^2 \delta i] \operatorname{erfc}[a(\delta i)^{1/2}] - \exp[a^2 \delta (i-1)] \operatorname{erfc}[a(\delta (i-1))^{1/2}]$$

$$\aleph_{z(i)} = a|\omega|(z)^{-1} \left\{ \exp[z\delta i] \operatorname{erf}[|\omega|(\delta i)^{1/2}] - \exp[z\delta (i-1)] \operatorname{erf}[|\omega|(\delta (i-1))^{1/2}] \right\}$$

$$Q_{z(i)} = a\omega(z)^{-1}\{\exp[z\delta i] - \exp[z\delta(i-1)]\}$$

$$\Re_{y(i)} = a|\xi|(y)^{-1}\{\exp[y\delta i] \operatorname{erf}[|\xi|(\delta i)^{1/2}] - \exp[y\delta(i-1)] \operatorname{erf}[|\xi|(\delta(i-1))^{1/2}]\}$$

$$Q_{y(i)} = a\xi(y)^{-1}\{\exp[y\delta i] - \exp[y\delta(i-1)]\}$$

$$T_{(i)} = a(k)^{1/2}(y^{-1} - z^{-1})\{\operatorname{erf}[(k\delta i)^{1/2}] - \operatorname{erf}[(k\delta(i-1))^{1/2}]\}$$

Los sub-intervalos utilizados (q) para el paso de integración numérica fueron 50, esto significa que el diferencial de tiempo δ se obtiene al dividir al período de la onda cuadrada en 50 sub-intervalos.

Los cálculos se realizaron empleando los siguientes parámetros:

$$k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}, \quad k_{chem} = 1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}, \quad K = 0,01, \quad \alpha = 0,40, \quad n = 2, \quad C^* = 0,3 \mu\text{M}, \quad E^0 = -1,098 \text{ V}, \quad D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}, \quad A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2.$$

Comparación entre el comportamiento experimental y el estudio teórico

Una vez obtenidas las ecuaciones matemáticas que representan al proceso EC, se comparan con los resultados experimentales para corroborar y asegurarse que el modelo sea correcto.

La Figura 14 muestra las respuestas de corrientes neta medida mediante SWV para el mecanismo simulado (Figura 14 A), los resultados experimentales (Figura 14 B) y la superposición de ambas respuestas (Figura 14 C). Las corrientes I_d e I_r se muestran en verde y azul respectivamente, los círculos corresponden a la corriente experimental y en línea llena lo predicho teóricamente. Los voltagramas experimentales han sido divididos por $f^{1/2}$ y todas las corrientes fueron normalizadas para facilitar la comparación.

Al igual que en el sistema catalítico tipo 2 sin adsorción, se puede notar de la Figura 14 que, durante el intervalo de potenciales desde -1,2 V hasta -1,5 V ocurre el

proceso de reducción. Al no detectarse un pico en I_r , evidencia una transferencia de carga lenta acoplada a una reacción química rápida, deducido por la forma de las curvas voltamétricas. Al ser rápida la reacción química permite que siempre esté presente, en la superficie del electrodo, la especie O ($Cr(III) - NO_3^- - DTPA$). Al comparar ambas curvas en la Figura 14 C se puede observar una excelente coincidencia entre ambas respuestas.

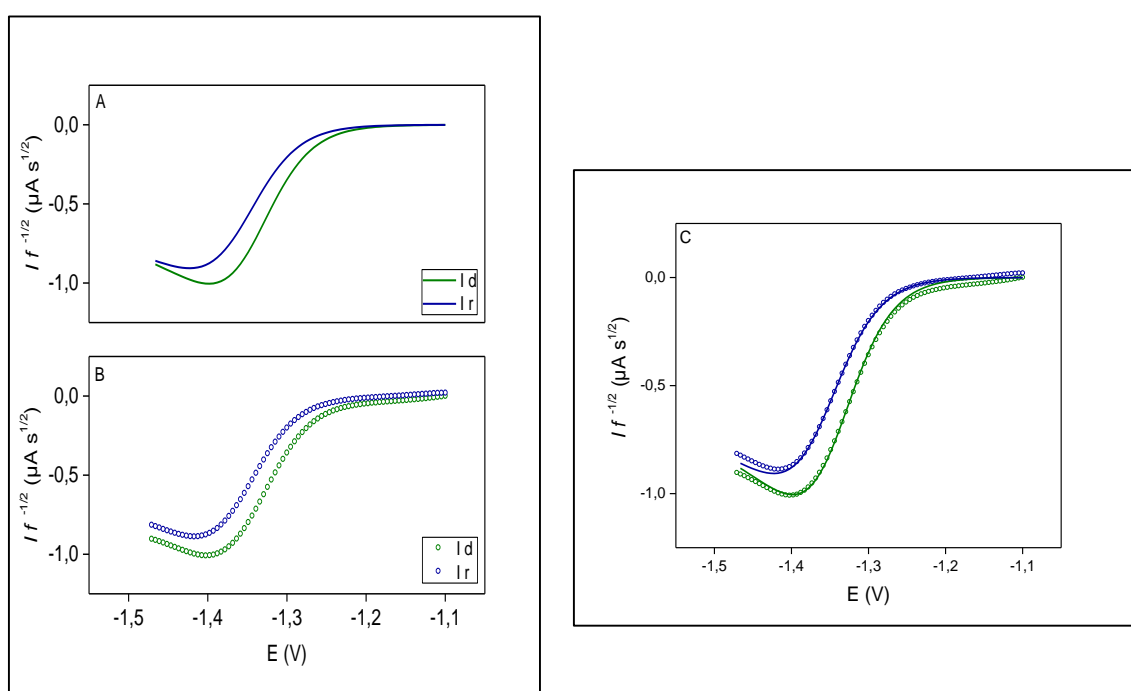


Figura 14: Respuesta de corriente en función de potencial para el barrido de redisolución mediante SWV, corriente directa I_d (—) e I_r (—). (A) resultados teóricos para mecanismo tipo 2 con adsorción del complejo $Cr(III) - DTPA$, (B) resultados experimentales y (C) corrientes simulada (—) y experimentales (●) superpuestas. Los resultados teóricos son calculados a partir de la Ec.63 con $k_s = 1,02 \times 10^{-2} s^{-1}$, $k_{chem} = 2,5 \times 10^4 s^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E_{ad}^0 = -0,95 V$, $D = 4 \times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} cm^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son para $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \mu M$, $DTPA = 5 mM$, $KNO_3 = 0,1 M$ y $pH = 6$ y determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 30 s$, $E_{SW} = 10 mV$, $dE = 5 mV$ y $f = 100 Hz$.

Estudio sobre la dependencia de la corriente respecto la frecuencia

La Figura 15 muestra la dependencia de la corriente neta normalizada por $f^{1/2}$ en función del potencial. Las distintas respuestas de corriente que se presentan fueron logradas a partir de distintos valores de frecuencias: (A) 50 Hz, (B) 100 Hz y (C) 200 Hz. Las líneas llenas azules representan la corriente neta obtenida de manera teórica, mientras que los círculos vacíos corresponden a los valores experimentales.

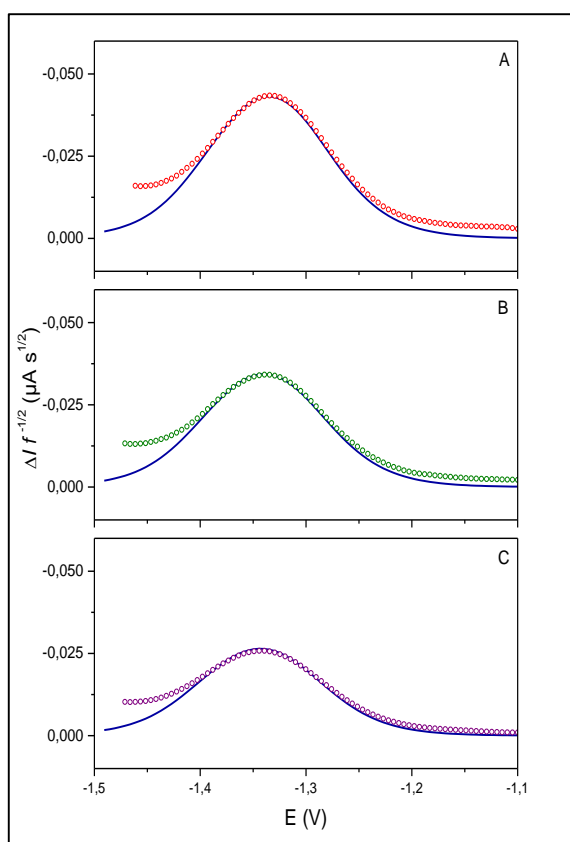


Figura 15: Dependencia de la corriente neta en función del potencial para distintos valores de frecuencia. Curvas experimentales (●) y simulada (—). (A) 50 Hz, (B) 100 Hz y (C) 200 Hz. Los resultados teóricos son calculados a partir de la Ec. 63 con $k_s = 1,02 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_{chem} = 2,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E_{ad}^0 = -0,95 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son para $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \text{ } \mu\text{M}$, $DTPA = 5 \text{ mM}$, $KNO_3 = 0,1 \text{ M}$ y $pH = 6$ y determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $E_{SW} = 50 \text{ mV}$ y $dE = 5 \text{ mV}$.

Como puede verse, de la Figura 15, todos los voltagramas presentan forma de campana simétrica para la corriente neta tanto simulada como experimental en todos los valores de frecuencias evaluados. También se observa que el pico de corriente neta disminuye al aumentar f , coincidiendo con tendencias encontradas en sistemas cuasi-reversibles acoplados a una reacción química rápida [28]. Es importante destacar que se utilizó el mismo factor de escala con un valor muy cercano a $3 \times 10^{-7} \text{ A s}^{1/2}$ para ajustar todas las curvas experimentales respecto a las simuladas, al igual que en el mecanismo tipo 2 sin adsorción.

La diferencia en los valores de corriente experimental respecto a la simulada a potenciales más negativos que $-1,4\text{V}$, puede deberse a un segundo proceso correspondiente a la reducción de los protones $(\text{H}^+)_{(\text{ac})}$ a $\text{H}_2(\text{g})$.

La dependencia de $\Delta I_p f^{-1/2}$ (A) y E_p (B) en función de la frecuencia se muestran en la Figura 16. Las líneas llenas azules corresponden a las respuestas teóricas mientras que los círculos verdes a los resultados experimentales.

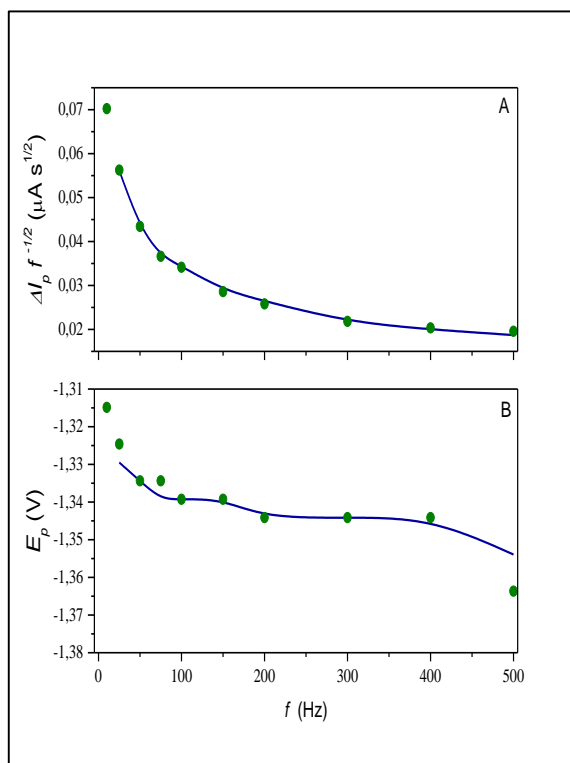


Figura 16: Dependencia de (A) $\Delta I_p f^{-1/2}$ y (B) E_p en función de la frecuencia para resultados teóricos (—) y experimentales (●). Los resultados teóricos son calculados a partir de la Ec. 63 con $k_s = 1,02 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_{chem} = 2,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E_{ad}^0 = -0,95 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son para $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \text{ } \mu\text{M}$, $DTPA = 5 \text{ mM}$, $KNO_3 = 0,1 \text{ M}$ y $pH = 6$ y determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ y $dE = 5 \text{ mV}$.

Puede destacarse de la Figura 16 la excelente coincidencia en el comportamiento tanto para $\Delta I_p f^{-1/2}$ como E_p en función a f entre los resultados teóricos y experimentales.

También es importante remarcar que el potencial de pico puede determinarse cercano a $-1,34 \text{ V}$, para casi todo el intervalo de frecuencias evaluado. Este no es un valor constante y se vuelve más negativo con el incremento de la frecuencia.

Estudio sobre la dependencia de la corriente respecto de la amplitud

En la Figura 17 se muestran las corrientes tanto directa como inversa normalizadas por $f^{1/2}$ en función del potencial, en verde y azul, respectivamente. Los voltagramas que se muestran han sido obtenidos a partir de distintos valores de amplitud: (A) 10 mV, (B) 75 mV y (C) 150 mV. Las líneas llenas representan las corrientes I_d e I_r teóricas y los círculos vacíos, las experimentales.

De la Figura 17 puede notarse que existe un excelente ajuste entre las corrientes simuladas y las experimentales. También es importante destacar de la Figura que al aumentar la amplitud los perfiles de I_d e I_r se hacen cada vez más diferentes, observándose que el perfil catalítico, forma sigmoidea, obtenido con valores bajos de amplitud (Figura 17 A) se pierde al aplicar pulsos mayores (Figura 17 C).

Teniendo en cuenta que la corriente directa depende del aporte de la difusión de especies y de la reacción catalítica, el decaimiento del perfil catalítico podría deberse a que cuando se aplican potenciales notablemente más negativos que el potencial del pico de reducción el aporte de especies adsorbidas prácticamente desaparece.

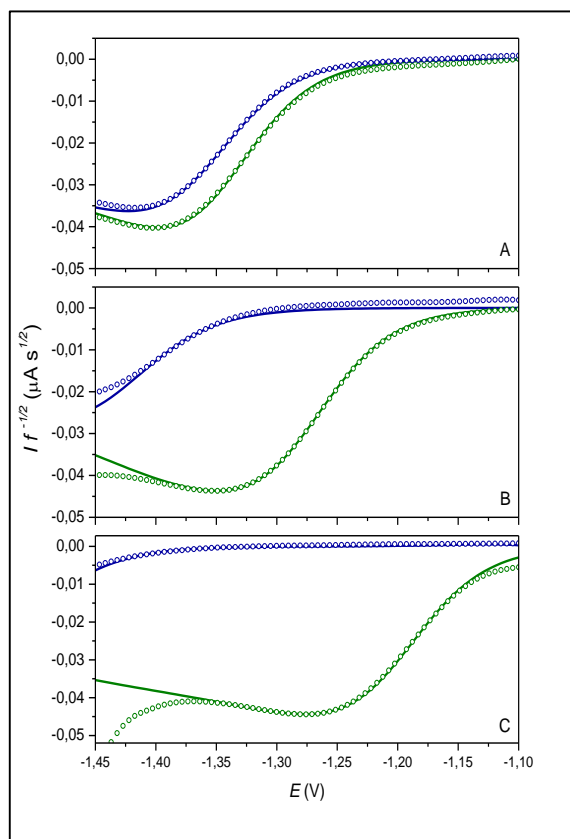


Figura 17: Respuesta de corriente en función de potencial para el barrido de redisolución mediante SWV, corriente directa I_d (—) e I_r (—) para distintos valores de amplitud: (A) 10 mV, (B) 75 mV y (C) 150 mV. Corriente experimental (○) y simulada (—). Los resultados teóricos son calculados a partir de la Ec. 63 con $k_s = 1,02 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_{chem} = 2,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E_{ad}^0 = -0,95 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son para $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \text{ } \mu\text{M}$, $DTPA = 5 \text{ mM}$, $KNO_3 = 0,1 \text{ M}$ y $pH = 6$ y determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $dE = 5 \text{ mV}$ y $f = 100 \text{ Hz}$.

Por otra parte, se puede observar que el aumento de la amplitud no afecta la reversibilidad aparente del proceso electroquímico global, por lo que la corriente inversa mantiene su comportamiento irreversible. En los datos experimentales se observa además la aparición de un segundo proceso cuando el potencial aplicado es más negativo que $-1,4 \text{ V}$ y que estaría vinculado con la reducción de protones.

La Figura 18 muestra los valores de corriente neta normalizadas por $f^{1/2}$ en función del potencial. Los voltagramas se obtuvieron para diferentes valores de

amplitud: 10 mV, 75 mV y 150 mV para los gráficos A, B y C, respectivamente. Las líneas llenas azules representan los resultados teóricos mientras que los círculos vacíos, las curvas experimentales.

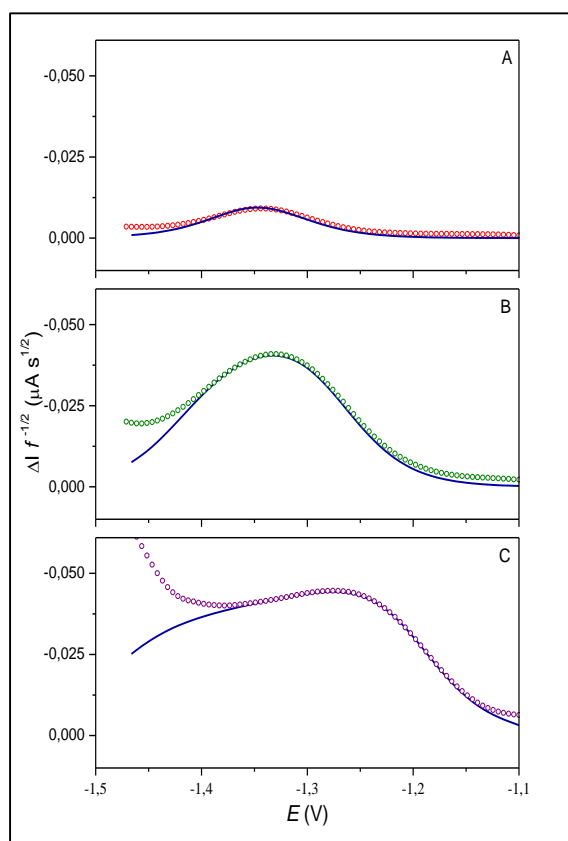


Figura 18: Dependencia de la corriente neta en función al potencial para distintos valores de amplitud: (A) 10 mV, (B) 75 mV y (C) 150 mV. Curvas experimentales (○) y curvas simuladas (—). Los resultados teóricos son calculados a partir de la Ec. 63 con $k_s = 1,02 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_{chem} = 2,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E_{ad}^0 = -0,95 \text{ V}$, $D = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son para $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \text{ } \mu\text{M}$, $DTPA = 5 \text{ mM}$, $KNO_3 = 0,1 \text{ M}$ y $pH = 6$ y determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 \text{ V}$, $t_{ac} = 30 \text{ s}$, $dE = 5 \text{ mV}$ y $f = 100 \text{ Hz}$.

Puede notarse en la Figura 18 que los voltagramas presentan forma de campana simétrica para las amplitudes más bajas. No obstante, dicha simetría se pierde al aplicar una amplitud de 150 mV. Esto podría deberse a los procesos que afectan a las componentes de la corriente directa e inversa de este pico faradaico. El cambio

en la simetría de la corriente neta se debería a que la componente directa cae lentamente a medida que se supera el pico de corriente de reducción, mientras que la inversa mantiene su comportamiento irreversible. En los datos experimentales se observa además la aparición de un segundo proceso cuando el potencial aplicado es más negativo que -1,4 V y que estaría vinculado a la reducción de protones. El excelente ajuste que se observa entre las respuestas de corriente simulada y experimental se mantiene para amplitudes altas, reproduciendo los distintos cambios morfológicos de los voltagramas correspondientes a la corriente neta.

El análisis de la dependencia de $\Delta I_p E_{sw}^{-1}$ (A) y E_p (B) en función de la amplitud se muestran en la Figura 19, al igual que en las figuras anteriores, las líneas llenas azules muestran las tendencias teóricas y los círculos verdes las experimentales.

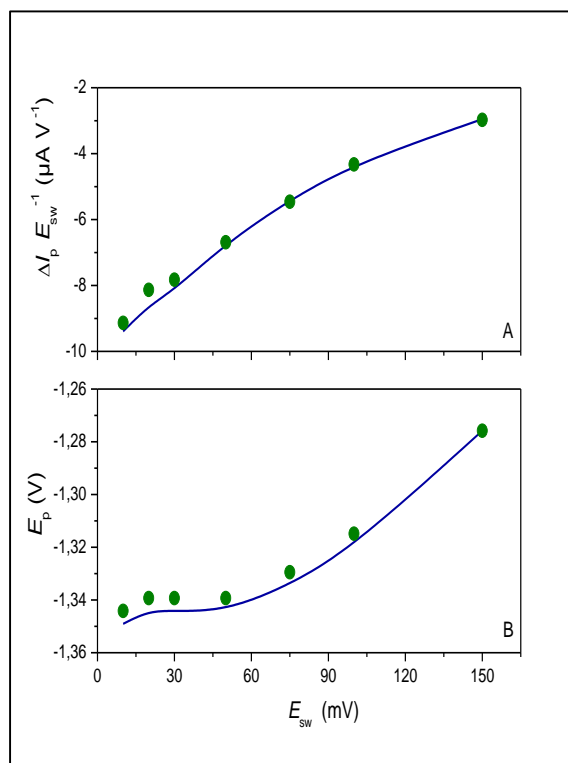


Figura 19: Dependencia de (A) $\Delta I_p E_{sw}^{-1}$ y (B) E_p en función del potencial para resultados teóricos (—) y experimentales (●). Los resultados teóricos son calculados a partir de la Ec. 63 con $k_s = 1,02 \times 10^{-2} s^{-1}$, $k_{chem} = 2,5 \times 10^4 s^{-1}$, $K = 0,01$, $\alpha = 0,40$, $E_{ad}^0 = -0,95 V$, $D = 4 \times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$, $A = 4 \times 10^{-3} cm^2$ y $n = 2$. Los valores experimentales son para $K_2Cr_2O_7 = 0,15 \mu M$, $DTPA = 5 mM$, $KNO_3 = 0,1 M$ y $pH = 6$ y determinados con los siguientes parámetros electroquímicos: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 30 s$, $dE = 5 mV$ y $f = 100 Hz$.

Puede destacarse de los gráficos de la Figura 19 A y B el excelente ajuste tanto para el comportamiento $\Delta I_p E_{sw}^{-1/2}$ como para E_p en función a E_{sw} entre los resultados experimentales y los ajustes realizados con el modelo teórico planteado específicamente para este sistema. Este excelente ajuste da indicios que el sistema catalítico tipo dos modificado es un modelo que representaría de manera efectiva al mecanismo de las reacciones que ocurren con la técnica electroquímica de especiación desarrollada en esta tesis.

Conclusiones del estudio teórico y experimental de voltametría de redisolución catódica de especies de Cr inorgánico

Con el fin de responder la pregunta disparadora de este capítulo: ¿Es posible conocer el mecanismo de las reacciones que ocurren con la técnica electroquímica de especiación desarrollada? Se modeló el mecanismo de la reacción de reducción de $Cr(III) - DTPA$ en presencia de NO_3^- tal como está planteado en bibliografía. Sin embargo, los resultados obtenidos, considerando un mecanismo catalítico tipo 1 no permiten explicar los resultados experimentales, ya que al comparar las curvas teóricas con las experimentales se encontró la transferencia de 2 electrones, lo que no coincide con la reducción de $Cr(III) - DTPA$ ya que involucra solo un electrón formando $Cr(II) - DTPA$. Esto llevó a realizar un estudio mecanístico más profundo, proponiendo una situación diferente.

Las curvas experimentales muestran un excelente acuerdo con los perfiles teóricos correspondientes a un mecanismo catalítico tipo 2 con adsorción. Para entender esto, se podría considerar que el complejo $Cr(III) - DTPA$, reacciona con el ion NO_3^- para producir la especie electroactiva $Cr(III) - NO_3 - DTPA$. Como las curvas calculadas requieren de 2 electrones para ajustarse a los perfiles experimentales, se propone que se libere NO_2^- a la solución como producto del paso electroquímico. En otras palabras, el complejo de $Cr(III) - DTPA$ funcionaría como catalizador para la reducción de NO_3^- a NO_2^- .

Se logró conocer la dependencia general de la corriente en función de la frecuencia y la amplitud, como así también relacionarlas con los resultados experimentales.

Otros resultados interesantes, obtenidos en este estudio, fueron los valores de $k_s = 9,4 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ y $K = 0,01$, los que indican que la reacción electroquímica es bastante irreversible. Teniendo en cuenta que $K = 0,01$, fue posible estimar las

constantes cinéticas de la reacción química como $k_1 = 1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ y $k_{-1} = 1,29 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. Estos valores de k_1 y k_{-1} indican un intercambio rápido de moléculas de agua e iones de nitrato donde el equilibrio favorece al complejo con agua. También se encontró un valor de E° cercano a -1.1 V. Independientemente de que las curvas experimentales y simuladas presenten un ajuste muy bueno, la precisión para la determinación de parámetros cinéticos y termodinámicos, como k_s , k_{chem} , α y E° , está limitado. Esto se debe a que se pueden obtener perfiles similares aumentando un parámetro y disminuyendo otro. En este sentido, es importante tener en cuenta que los resultados de esos cálculos están restringidos por regiones de confianza que dependen de la interacción de las variables involucradas [30].

Apéndice

Lista de símbolos y abreviaturas

A	Área del electrodo
a	Variable auxiliar de adsorción
C_o	Concentración de la especie electroactiva oxidada
C_o^*	Concentración de la especie electroactiva oxidada, en el seno de la solución
C_r	Concentración de la especie electroactiva reducida
C_r^*	Concentración de la especie electroactiva reducida, en el seno de la solución
C_Y	Concentración de la especie catalizadora de la reacción
C_Y^*	Concentración de la especie catalizadora, en el seno de la solución
C_P	Concentración de la especie intermediaria de la reacción
D	Coeficiente de difusión
δ	Número de veces que se integra un paso
dE	Incremento de potencial
E_{sw}	Amplitud de onda cuadrada
$E(t)$	Función de potencial de onda cuadrada
E^o	Potencial formal de la reacción redox
E_p	Potencial de pico
F	Constante de Faraday
f	Frecuencia de onda cuadrada
Γ_o	Concentración de la especie oxidada en la superficie del electrodo
Γ_o^{ini}	Concentración inicial de la especie oxidada en la superficie del electrodo
$I(t)$	Corriente dimensional
ΔI_p	Corriente neta de pico
k_{ad}	Constante de adsorción
k_s	Constante de velocidad de transferencia de carga

k_{chem}	Constante de velocidad catalítica de pseudo-primer orden
k_1	Constante de velocidad de pseudo-primer orden para reacción directa
k_{-1}	Constante de velocidad de pseudo-primer orden para reacción inversa
K	Constante de formación
n	Numero de electrones intercambiados
$\varphi(t)$	Función potencial adimensional
ϕ	Función concentración auxiliar
$\Psi(t)$	Función corriente adimensional
$\Delta\Psi_p$	Corriente neta de pico adimensional
$\Delta\Psi$	Corriente neta adimensional
q	Numero de sub-intervalos en cada onda
t	tiempo
θ	Función concentración auxiliar
x	Distancia desde la superficie del electrodo
r_s	Constante de adsorción estándar
E_{ad}^o	Potencial formal para reacciones redox con especies adsorbidas $E_{ad}^o = E^o + (RT/nF) \ln(K_{ad})$

Bibliografía

- [1] A. Molina, Editorial: Fundamentals and Theoretical Electrochemistry, Curr. Opin. Electrochem. 1 (2017) A2–A4.
- [2] C.G. Zoski, Nanoscale scanning electrochemical microscopy: Emerging advances in applications and theory, Curr. Opin. Electrochem. 1 (2017) 46–52.
- [3] O.A. Oviedo, E.P.M. Leiva, Computational study of nanostructured materials, Curr. Opin. Electrochem. 1 (2017) 1–6.
- [4] V. Mareček, Z. Samec, Ion transfer kinetics at the interface between two immiscible electrolyte solutions supported on a thick-wall micro-capillary. A mini review, Curr. Opin. Electrochem. 1 (2017) 133–139.
- [5] D.W.M. Arrigan, G. Herzog, Theory of electrochemistry at miniaturised interfaces between two immiscible electrolyte solutions, Curr. Opin. Electrochem. 1 (2017) 66–72.
- [6] L. Rajendran, M. Kirthiga, E. Laborda, Mathematical modeling of nonlinear reaction–diffusion processes in enzymatic biofuel cells, Curr. Opin. Electrochem. 1 (2017) 121–132.
- [7] V. Fourmond, C. Léger, Modelling the voltammetry of adsorbed enzymes and molecular catalysts, Curr. Opin. Electrochem. 1 (2017) 110–120.
- [8] C. Montella, The impedance spectroscopy response for a reversible electrode reaction based on diffusion limited chronoamperometry at an inlaid disk electrode, J. Electroanal. Chem. 776 (2016) 180–187.
- [9] L.K. Bieniasz, A New Theory of Potential Step Chronoamperometry at Hemispheroidal Electrodes: Complete Explicit Semi-Analytical Formulae for

- the Faradaic Current Density and the Faradaic Current, *J. Electroanal. Chem.* 784 (2017) 91–101.
- [10] R. Kumar, S. Dhillon, R. Kant, Influence of viscosity on chronoamperometry of reversible redox system on rough and nanoparticles deposited Pt electrode: Aqueous/glycerol and RTIL medium, *J. Electroanal. Chem.* 780 (2016) 337–354.
- [11] Q. Chi, M.J. Ford, A. Halder, N.S. Hush, J.R. Reimers, J. Ulstrup, Sulfur ligand mediated electrochemistry of gold surfaces and nanoparticles: What, how, and why, *Curr. Opin. Electrochem.* 1 (2017) 7–15.
- [12] J.J. Calvente, R. Andreu, Intermolecular interactions in electroactive thiol monolayers probed by linear scan voltammetry, *Curr. Opin. Electrochem.* 1 (2017) 22–26.
- [13] J. Puy, J. Galceran, Theoretical aspects of dynamic metal speciation with electrochemical techniques, *Curr. Opin. Electrochem.* 1 (2017) 80–87.
- [14] M. Cuéllar, S.N. Vettorelo, P.I. Ortiz, F. Garay, Theoretical and experimental study of the catalytic cathodic stripping square-wave voltammetry of chromium species, *J. Solid State Electrochem.* 20 (2016) 3279–3286.
- [15] A. Bobrowski, A. Królicka, J. Zarębski, Characteristics of voltammetric determination and speciation of chromium - A Review, *Electroanalysis*. 21 (2009) 1449–1458.
- [16] A. Bobrowski, B. Baś, J. Dominik, E. Niewiara, E. Szalińska, D. Vignati, J. Zarębski, Chromium speciation study in polluted waters using catalytic

adsorptive stripping voltammetry and tangential flow filtration, *Talanta*. 63 (2004) 1003–1012.

- [17] J.M. Pingarrón Carrazón, P. Sánchez Batanero, *Química Electroanalítica Fundamentos y Aplicaciones*, Primera Ed, Madrid, 1999.
- [18] E. Espada-Bellido, Z. Bi, C.M.G. Van Den Berg, Determination of chromium in estuarine waters by catalytic cathodic stripping voltammetry using a vibrating silver amalgam microwire electrode, *Talanta*. 105 (2013) 287–291.
- [19] R. Ouyang, W. Zhang, S. Zhou, Z.L. Xue, L. Xu, Y. Gu, Y. Miao, Improved Bi film wrapped single walled carbon nanotubes for ultrasensitive electrochemical detection of trace Cr(VI), *Electrochim. Acta*. 113 (2013) 686–693.
- [20] M. Boussemart, C.M.G. Van Den Berg, M. Ghaddaf, The Determination of the Chromium Speciation in Sea-Water Using Catalytic Cathodic Stripping Voltammetry, *Anal. Chim. Acta*. 262 (1992) 103–115.
- [21] Y. Li, H. Xue, Determination of Cr(III) and Cr(VI) species in natural waters by catalytic cathodic stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta*. 448 (2001) 121–134.
- [22] R. Bucci, A.L. Magri, A. Napoli, Chromium(III) Complexes with Diethylenetriaminepentaacetic Acid, *J. Coord. Chem*. 24 (1991) 169–175.
- [23] S. Kotrlý, L. Sucha, *Handbook of chemical equilibria in analytical chemistry*, 1985.
- [24] V. Mirčeski, A. Bobrowski, J. Zarebski, F. Spasovski, Electrocatalysis of the first and second kind: Theoretical and experimental study in conditions of square-wave voltammetry, *Electrochim. Acta*. 55 (2010) 8696–8703.

-
- [25] J. Zarębski, A. Bobrowski, M. Putek, A. Królicka, Voltammetric Studies of the Co(II)-Tris(hydroxymethyl)-aminomethane and Sodium Perborate Volumetric Catalytic System, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74 (2009) 1715–1725.
- [26] V. Mirčeski, Š. Komorsky-Lovrić, M. Lovrić, *Square-Wave Voltammetry Theory and Application*, 2007.
- [27] D.E. Smith, Alternating Current Polarography of Electrode Processes with Coupled Homogeneous Chemical Reactions, *Anal. Chem.* 35 (1963) 602–609.
- [28] F. Garay, M. Lovrić, Square-wave voltammetry of quasi-reversible electrode processes with coupled homogeneous chemical reactions, *J. Electroanal. Chem.* 518 (2002) 91–102.
- [29] S.N. Vettorelo, F. Garay, Adsorptive square-wave voltammetry of quasi-reversible electrode processes with a coupled catalytic chemical reaction, *J. Solid State Electrochem.* 20 (2016) 3271–3278.
- [30] M. Gutierrez, A. Henglein, Chemical action of pulsed ultrasound: observation of an unprecedented intensity effect, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 3625–3628.

Estudio del efecto del Cr(VI) en plantas de
Rúcula de la especie Eruca sativa



Pregunta disparadora

¿Cómo afecta al desarrollo y al sistema de defensa de plantas comestibles la exposición crónica a Cr(VI)?

Objetivos

Evaluar la capacidad del suelo de acumular Cr(VI).

Evaluar la capacidad de la planta de rúcula de la especie *Eruca sativa* para acumular Cr(VI).

Determinar el contenido de polifenoles totales y el perfil de polifenoles en planta de rúcula de la especie *Eruca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Cr(VI).

Evaluar la correlación entre la capacidad antioxidantes y el contenido de polifenoles totales en planta de rúcula de la especie *Eruca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Cr(VI).

Sistema de defensa de plantas frente a la exposición de metales pesados

Las principales vías de entrada de los metales a las plantas son el aire, el agua y el suelo, siendo las plantas un punto de conexión importante entre la parte abiótica y biótica del ecosistema en la transferencia de metales [1]. Los principales riesgos ambientales en la transferencia de metales pesados desde el suelo o el agua de riego a las plantas son la pérdida de cobertura vegetal o pérdida de la productividad de cultivos por su fitotoxicidad y el ingreso de los metales en la cadena trófica, ya que la absorción de metales por plantas tolerantes pueden producir efectos tóxicos tanto en la flora y fauna como en humanos [2]. Debido a que los metales pueden ser transferidos a los cultivos desde el suelo, es que surge la necesidad de conocer la

concentración de los metales tanto en los suelos como en el agua de irrigación de los cultivos para evaluar si sus concentraciones son, o no, adecuadas para la agricultura [3–5].

En general, la toxicidad de los metales pesados se debe a la gran afinidad por moléculas orgánicas. Éstos tienen la capacidad de unirse a grupos sulfhídricos, radicales, amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo, también pueden actuar desplazando iones metálicos esenciales de algunas biomoléculas [6].

El comportamiento de las plantas frente a este tipo de metales no es uniforme, dependiendo de las especies e incluso de las variedades es que difieren en su capacidad para absorberlos, acumularlos y tolerarlos [7]. Las plantas presentan diferentes mecanismos de resistencia frente a la exposición a metales pesados, algunos son: exudación de complejos a través de la rizosfera, enlazándolos en la pared celular, prevención del transporte ascendente a partes superiores de la planta y almacenamiento de los metales en vacuolas, entre otros [8–10].

Las plantas tienen numerosos mecanismos para translocar y acumular micronutrientes (aun siendo tóxicos). Debido a esto es que se han detectado mayores niveles de micronutrientes en raíces en ciertos tipos de plantas, mientras que otras especies acumulan en hojas y tallos [11,12]. Existen otros casos en los cuales las plantas no tienen la capacidad de adaptarse y tolerar altas concentraciones de metales en sus tejidos, debido a la imposibilidad de estos organismo afectado para excretar los niveles innecesarios de metales [6].

Los metales pesados pueden afectar el normal funcionamiento de las plantas debido a que inhiben la actividad de proteínas y enzimas, también pueden llegar a desnaturalizar las mismas hasta distorsionar la integridad de la membrana citoplasmática, afectando a la respiración celular y fotosíntesis [13–15]. Otro efecto

producido por la acumulación de estos metales es el estrés oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno (ROS) o radicales libres. La razón de este efecto se debe a que los metales funcionan como catalizadores de reacciones que generan este tipo de especies [6].

El estrés oxidativo ocurre por el exceso de ROS, esto produce un desbalance celular entre las especies antioxidantes y las oxidantes. Las células intentan generar un estado de equilibrio mediante un sistema de defensa antioxidante endógeno. Este sistema de defensa elimina las especies reactivas de oxígeno al mismo tiempo que son generadas. Las plantas producen, a nivel celular, compuestos antioxidantes que puede prevenir, reducir o retrasar la destrucción oxidativa [16].

Este sistema de defensa conocido como la capacidad antioxidante celular puede llevarse a cabo a partir de compuestos enzimáticos y no enzimáticos, estos últimos tienen un rol crucial en la defensa celular ya que actúan como cofactores de los antioxidantes enzimáticos [16]. Estas vías de eliminación de ROS generalmente son específicas de cada especie y tejidos, así como dependientes del metal pesado y de la intensidad del estrés [17,18].

Respecto a los componentes enzimáticos se pueden mencionar la peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa que junto a otras enzimas del ciclo ascorbato-glutación promueven la limpieza de ROS [16]. Los compuestos no enzimáticos incluyen al ascorbato y glutación, como así también tocofenoles, carotenoides y compuestos fenólicos [18].

Los compuestos fenólicos forman parte de numerosos grupos de metabolitos secundarios en las plantas [18,19]. Dentro de estas moléculas, aquellas con estructura flavonoide (Figura 1) forman parte de los antioxidantes más importantes en vegetales debido a su habilidad para quelar metales, inhibir enzimas y captar

radicales libres. La capacidad de inhibir los eventos mediados por radicales libres se debe a la estructura química de los mismos. En algunos casos, se forma un complejo metal-flavonoide que resulta ser más eficiente para la eliminación de ROS que el flavonoide inicial [18,19].

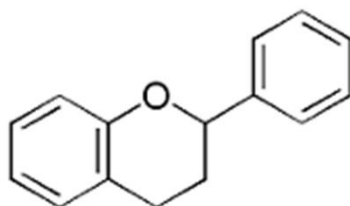


Figura 1: Estructura molecular de la base estructural de una molécula flavonoide.

Las especies radicalarias como el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidropéroxilo (HO_2^{\bullet}), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), óxido nítrico (NO), y otras especies como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y ácido hipocloroso (HOCl) son consideradas como las especies reactivas de oxígeno [17].

El estrés oxidativo producido por metales pesados con capacidad redox, tales como Fe, Cu y Cr se debe a que estos elementos tienen la capacidad de producir H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ que pueden involucrarse en ciclos celulares como la reacción de Fenton y la de Haber-Weiss [6,16,18].

Es importante destacar que muchas ROS son producidas como consecuencia del metabolismo normal de las células, a partir del oxígeno molecular (O_2) utilizado para obtener energía. El H_2O_2 , por ejemplo, es generado principalmente en células vegetales durante los procesos de fotosíntesis, fotorrespiración y respiración celular, por lo tanto, la generación de este tipo de especies es un aspecto inevitable en la vida de los organismos aerobios [18].

Plantas de rúcula: fuentes ricas en polifenoles

En los últimos años se ha incrementado la conciencia respecto al consumo de alimentos que contribuyan diariamente en un desarrollo saludable, ya que, al desempeñar un papel importante modulando algunos procesos degenerativos, influyen en la calidad de vida humana [20,21]. Por ejemplo, las verduras pertenecientes a la familia *Brassicaceae* tales como coles de Bruselas, repollo, brócoli, berro, coliflor y rúcula están relacionadas con una reducción potencial en el riesgo de cáncer [20–22].

Muchas investigaciones se han centrado en cultivos de hortalizas de la familia *Brassicaceae*, puesto que son fuentes ricas en compuestos bioactivos con propiedades quimioprotectoras. Estos compuestos incluyen familias de glucosinolatos, flavonoides, fibra, ácido fólico y carotenoides [20,22]. Estas investigaciones han revelado una asociación inversa entre un alto consumo de verduras *Brassica* y un menor riesgo de incidencia de cáncer [20].

Dentro de la familia de verduras *Brassica*, las de hoja verde han ganado atención por parte de los consumidores e investigadores. En particular, las especies de rúcula como *Eruca vesicaria* y *Eruca sativa* resultan de gran interés debido a la amplia gama de fitoquímicos promotores de la salud, puesto que están asociados con propiedades anticancerígenas [20]. Estas especies de rúcula presentan compuestos promotores de la salud tales como carotenoides, vitamina C, fibras, glucosinolatos, flavonoides y compuestos fenólicos [20,21,23], todos éstos son susceptibles a las condiciones ambientales antes y después de la cosecha, lo que afecta el perfil cualitativo y cuantitativo de los fitonutrientes en estas verduras de hojas [22].

Las plantas de rúcula, tradicionalmente, tienen un amplio uso medicinal ya que se las utiliza como astringente, diurético, digestivo, emoliente, tónico, depurativo,

laxante, rubefaciente y estimulante [24]. Sumado al uso tradicional y a la amplia gama de fitoquímicos presentes en plantas de rúcula, presentan un potencial económico en aumento debido a su corto ciclo biológico (30-60 días) [25].

En las últimas décadas se ha acentuado el interés por los compuestos fenólicos y flavonoides provenientes de distintas plantas, ya que éstos tienen actividades antioxidantes directas y de eliminación de radicales libres, también pueden inducir la expresión de diversos genes que codifican enzimas metabólicas que se cree que disminuyen el riesgo de diversas enfermedades y trastornos, incluido el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las disfunciones inmunológicas [22]. Aunque los humanos se benefician del consumo de plantas con alta capacidad antioxidante, los compuestos fenólicos como los flavonoides tienen múltiples funciones en la planta relacionadas con la extinción de ROS, como la protección de la maquinaria fotosintética, defensa contra insectos masticadores y, también, como parte de la respuesta hipersensible al ataque de patógenos [22].

Materiales y métodos

Reactivos químicos y soluciones

Los reactivos utilizados fueron todos de calidad analítica (Sigma–Aldrich y Merck) y los ácidos HNO_3 y HCl sub-boiling se obtuvieron por destilación a través de un equipo Figmay S.A. Las soluciones, diluciones y blancos se prepararon con agua ultra-pura (Arium 611 UV system).

Todo el material utilizado fue lavado exhaustivamente de la siguiente manera: el material de vidrio se dejó toda la noche en una mezcla ácida de sulfo-nítrica (H_2SO_4 - HNO_3 2:1), luego se enjuagó con abundante agua ultra-pura para eliminar posibles residuos de metales. El material de teflón y plástico se sumergió en detergente

deionizado por 12 horas, enjuagándose con abundante agua, posteriormente se los dejó en HNO_3 50%, por 12 horas, y para finalizar se los enjuagó con abundante agua y se secó en estufa.

Para la determinación de la capacidad antioxidante y los compuestos polifenólicos, los estándares comerciales utilizados para el análisis mediante HPLC fueron de kaempferol y quercetina de Fluka (Dorset, U.K.), Para la extracción de los compuestos polifenólicos se utilizó metanol anhidro (Sintorgan) y ácido clorhídrico (J. T. Baker) grado analítico. Para la determinación de polifenoles totales se utilizó carbonato de sodio (Biopack) y reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich). En la determinación del perfil de polifenoles las fases móviles fueron preparadas con metanol grado HPLC (J. T. Baker) y ácido fórmico p.a. para espectroscopia de masas (Fluka). Antes del análisis por HPLC, las muestras se filtraron mediante filtros HVLP04700 de 0,45 μm (Millipore).

Fundamentos de la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

La espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es una técnica de análisis elemental inorgánico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica. La técnica presenta una gran sensibilidad, pudiendo cuantificar concentraciones desde ng L^{-1} hasta mg L^{-1} . Este sistema también permite determinar de manera rápida, mediante análisis multi-elemental, los elementos que componen a una muestra en un solo experimento.

El equipo de ICP-MS está formado por un plasma de acoplamiento inductivo (ICP), el cual se comporta como una fuente de ionización a presión atmosférica acoplado a un espectrómetro de masas (MS) al vacío, ambos equipos trabajan en serie.

En la Figura 2 se muestran de manera esquemática los componentes básicos que forman el equipo ICP-MS.

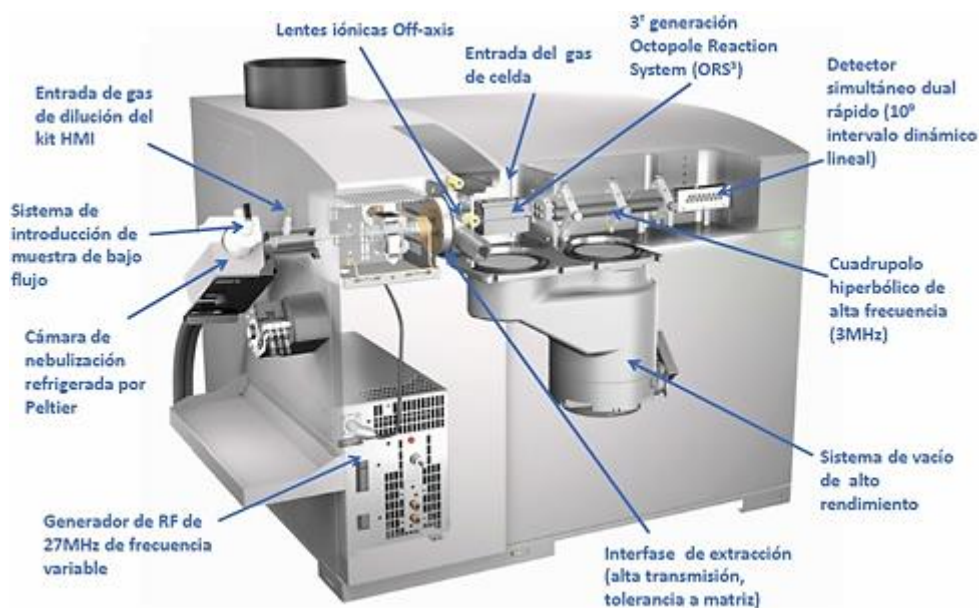


Figura 2: Componentes instrumentales básicos de un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente.

La muestra líquida ingresa a través de un autoanalizador (auto-sampler), ésta se convierte en aerosol y en la cámara de vaporizado se separa de los interferentes. El aerosol es transportado hacia la antorcha de plasma donde se ioniza la muestra. Los iones atraviesan la interfaz del espectrómetro de masas donde hay una cámara de vacío, ésta es la parte más crítica de todo el análisis, ya que los iones deben ser transportados eficientemente y mantener la integridad eléctrica lograda con el plasma, a presión atmosférica. Mediante unas lentes electrostáticas se dirigen los iones hacia la cámara principal de vacío, estas lentes tienen la función de centrar electrostáticamente el haz de iones hacia el dispositivo de separación de masa, mientras se detienen fotones, partículas y especies neutras para que no lleguen al detector. A continuación, el haz de iones pasa al corazón del espectrómetro de masa, donde ocurre la separación por masas de los fragmentos. Para finalizar el proceso,

se convierte en señal eléctrica a los diferentes fragmentos iónicos para poder procesarla y convertirla en concentración, mediante la calibración con estándares [26,27].

Equipamiento

Las muestras fueron analizadas por triplicado mediante un equipo de ICP-MS, Agilent 7500 cx, USA, equipada con un autosampler ASX-100 (CETAC Technologies, Omaha, NE), la variabilidad de las mediciones de ICP-MS estuvieron, en general, dentro del 97%.

Fundamentos de la cromatografía líquida HPLC-DAD-ESI-QTOF

Para la separación de componentes en muestras complejas, como extractos de plantas, se dispone de numerosas técnicas basadas en la diferencia de propiedades físico-químicas de los componentes de la muestra. Una de las técnicas más utilizadas es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Este tipo de cromatografía lleva a cabo la separación mediante la distribución de los componentes entre la fase móvil (disolvente) y una fase estacionaria (relleno de la columna). La separación ocurre en función a las distintas afinidades de los componentes hacia cada fase.

Luego de la separación, la detección de los analitos se realiza mediante espectrofotometría UV-Visible (UV-V) y espectroscopia de masas (MS). El sistema de detección basado en la absorción de radiación UV-V, se fundamenta en la interacción entre la radiación y la materia. Esto da lugar a un fenómeno de absorción de determinadas longitudes de onda de esa radiación por parte de los compuestos.

El detector más empleado en la actualidad utiliza batería de diodos, más conocidos como arreglo de diodos o "diodo array" (DAD).

La detección mediante UV-V se complementa con doble espectrometría de masa (MS/MS), ya que es una técnica selectiva y provee información estructural, separando los analitos en función al tiempo de migración e informando respecto a la relación masa/carga (m/z).

La espectrometría de masa (MS) se basa en la separación en vacío de iones en fase gaseosa de acuerdo a la relación m/z , uno de los elementos instrumentales esenciales para llevar a cabo esta técnica es el sistema de ionización. La ionización por spray eléctrico (electrospray **ESI**) es la más eficaz para el análisis de compuestos polares, lábiles y/o con alto peso molecular.

Una vez formados los iones, son dirigidos hacia el analizador de masas, el que permite la separación, detección y cuantificación de los compuestos con un alto grado de sensibilidad y selectividad. Los analizadores de cuadrupolo-tiempo de vuelo (**QTOF**) separa los iones según las distintas velocidades que adquieran en función a la relación m/z , el cuadrupolo permite seleccionar determinados iones para fragmentarlos posteriormente y volver a analizarlos según el tiempo de vuelo, aumentando la especificidad y sensibilidad de la técnica [28,29].

Equipamiento

El HPLC utilizado fue un Agilent Technology Serie 1200, equipado con una bomba de gradiente binario Agilent G1312B SL, un degasificador de solventes Agilent G1379B y un inyector automático Agilent G1367 D SL+WP.

La separación cromatográfica de los compuestos polifenólicos presentes en las muestras se realizó en una columna LUNA (Phenomenex, Torrance, CA, USA) de fase

reversa C18 (5 μ m, 250 mm \times 4,60 mm de diámetro interno) a 35 °C utilizando el módulo de calentamiento Agilent G1316 B. La separación de los compuestos se llevó a cabo utilizando ácido fórmico al 0,5 % v/v en agua y ácido fórmico al 0,5 % v/v en metanol. El flujo utilizado de la fase móvil para la separación de los compuestos fue de 0,4 mL/min y el volumen de inyección de muestra fue de 40 μ L.

El sistema de HPLC se acopló a un detector UV-VIS con arreglo de diodos (DAD) Agilent G1315 C Starlight DAD, conectado en tándem a un espectrómetro de masas de alta resolución (micrOTOF, Serie QII, Bruker Daltonics, USA) equipado con una fuente de ionización por electrospray.

Los espectros UV-VIS se registraron entre 200 y 600 nm. Los espectros de masas se registraron en un intervalo de 80 a 1500 m/z en modo negativo para el análisis de los polifenoles. Las condiciones de trabajo de la fuente de ionización ESI fueron las siguientes: voltaje del capilar, 4500 V; presión del gas de nebulización 4,0 bar; flujo del gas de secado, 8,0 L/min; y temperatura del gas de secado, 180 °C. Como gas de nebulización se utilizó N₂, mientras que el gas de colisión para obtener los espectros de MS/MS fue Ar. El detector de masas se programó para realizar un barrido de MS/MS de los 3 iones más abundantes, utilizando una energía de colisión de 13,0 eV. Los datos se obtuvieron mediante el programa Compass Versión 3.1 y el procesamiento de los mismos se llevó a cabo con el programa DataAnalysis Versión 4.0 (Bruker Daltonics, USA).

Parte experimental

Extracción de la fracción biodisponible de metales en muestras de suelo

La extracción de metales en suelo se realizó sobre muestras de 2,5 g las que se hicieron reaccionar con 25 mL de HCl 0,5 M durante 24 h a temperatura ambiente, en un vaso de precipitación de vidrio. Una vez finalizada la digestión las muestras se filtraron a través de una membrana de 0,45 μm de poro y luego se trasvasaron cuantitativamente a matraces de 25 mL completando con HNO_3 al 2 %. Finalmente, las muestras se guardaron en heladera a 4 °C hasta su análisis mediante espectrometría de plasma acoplado inductivamente con detector de masa (ICP-MS). Los resultados obtenidos mediante esta técnica corresponden a la concentración de Cr_{total} ya que no es posible especiar de manera directa mediante ICP-MS.

Todos los protocolos experimentales realizados en esta parte del trabajo doctoral, son empleados a diario en el laboratorio.

Extracción de metales en muestras de plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa*

Para la extracción de metales en muestras de rúcula se llevó a cabo un protocolo de digestión que consiste en hacer reaccionar 0,03 g de muestra liofilizada con ácidos puros previamente destilados: 3 mL de HNO_3 y 0,5 mL de HCl , durante 24 h a 220 °C. Las extracciones se realizaron en tubos de teflón con cierre hermético, luego se trasvasaron cuantitativamente a frascos de poliestireno de volumen final 5 mL. Las muestras se filtraron a través de membranas de 0,45 μm de diámetro de poro y se guardaron en heladera a 4 °C hasta su posterior análisis mediante ICP-MS. Los resultados obtenidos mediante esta técnica corresponden a la concentración de Cr_{total} ya que no es posible especiar de manera directa mediante ICP-MS.

Para validar la técnica de extracción se enriquecieron 0,03 g de muestra de rúcula liofilizada con concentraciones conocidas de Cr(VI) y a continuación se llevó a cabo el protocolo especificado para la digestión de las muestras como se describe en el párrafo anterior. Se determinaron los porcentajes de recuperación y los resultados obtenidos para 0,5 y 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de enriquecimiento fueron de $101\pm3\%$ y $100\pm6\%$, respectivamente. Estos resultados permiten establecer que la determinación de Cr(VI) no se ve afectada por la técnica de extracción del metal en la muestra.

Extracción de compuestos polifenólicos en muestras de plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa*

Para la extracción de los compuestos polifenólicos a 0,03 g de muestra liofilizada se le realizaron dos ciclos de homogeneización con 0,75 mL de metanol acidificado (HCl 0,1 % v/v), luego 15 min en un baño ultrasónico más 5 min de centrifugado a 12500 rpm, al finalizar el ciclo se separó el sobrenadante del sedimento, el cual fue tratado como se describe más adelante. Las dos fracciones de extractos obtenidas fueron combinadas y almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Todo el procedimiento se llevó a cabo protegiendo a las muestras de la luz y las extracciones fueron realizadas por triplicado.

Exposición de las plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa* a diferentes concentraciones de Cr(VI)

Para estudiar el efecto de la exposición a Cr(VI) en plantas de rúcula se llevó a cabo un ensayo desarrollado en tres etapas: crecimiento de las plantas, exposición a Cr(VI) y cosecha.

La primera se basó en sembrar semillas de rúcula de la especie *Eruca sativa* en macetas con tierra negra adquirida comercialmente y se las dejaron crecer durante un mes.

En la segunda etapa se dividieron las macetas en cuatro grandes grupos y se expusieron las plantas, mediante el riego, a tres concentraciones de Cr(VI) (25, 100 y 250 $\mu\text{g L}^{-1}$), dejando al cuarto grupo como control sin exposición a esta especie de Cr.

La cosecha se realizó a dos tiempos diferentes: luego de 15 y 21 días de exposición a Cr(VI). Una vez cumplido este tiempo, las plantas fueron recolectadas y liofilizadas (todas sus partes, raíces, hojas y tallos).

Las muestras liofilizadas fueron reducidas a un polvo fino mediante tratamiento en un mortero y se guardaron en freezer de -80 °C para su posterior análisis.

El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso antes y después de colocar hojas de rúcula (comercial) en estufa a 40 °C hasta llegar a peso constante, obteniéndose un porcentaje promedio de humedad de 90%.

Determinación de compuestos polifenólicos totales en plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa*: técnica de Folin-Ciocalteu

El contenido de polifenoles totales (PT) en productos vegetales se estudia mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. La técnica se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos mediante el reactivo "Folin-Ciocalteu", formado por ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico. La reducción de los ácidos a óxido de tungsteno y molibdeno puede ser determinada espectrofotométricamente ya que presentan un máximo de absorbancia a 750 nm [30].

Para la determinación del contenido de PT se colocaron en tubos de Khan 1,680 μL de agua ultra pura y 90 μL de metanol, se añadieron 20 μL de muestra apropiadamente diluida y 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla obtenida fue agitada en un vortex (Decalab, Argentina), luego de 1 min se agregaron 300 μL de Na_2CO_3 al 20 % p/v. La mezcla fue incubada por 120 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 750 nm contra un blanco de reactivo procesado de la misma forma. Determinándose por triplicado todas las muestras y los blancos.

Determinación del Perfil de polifenoles en plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa*

La optimización del método de análisis se realizó utilizando estándares comerciales representando distintas familias de compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos presentes en las muestras en estudio se identificaron de acuerdo a su tiempo de retención, espectro UV-VIS, masa exacta, espectro MS/MS, como así también por comparación con estándares comerciales y con compuestos descritos en la literatura.

La cuantificación de los compuestos identificados en las muestras se realizó utilizando el área del pico obtenido del cromatograma del ion extraído, mediante curvas de calibración externas de estándares polifenólicos disponibles. Para esto, se preparó una solución madre multi-componentes en metanol conteniendo quercetina y kaempferol, cada uno en concentración de 100 mg L^{-1} . Las curvas de calibración para cada compuesto se prepararon por diluciones apropiadas de dicha solución madre. Cuando no se contó con el estándar comercial de un compuesto identificado, su cuantificación se realizó a partir de un estándar con estructura similar. Los límites

de detección (LD) y cuantificación (LC) instrumentales se evaluaron experimentalmente considerando una relación señal/ruido (S/N) de 3,3 y 10 respectivamente. Los LD y LC fueron los siguientes: quercetina = 0,004 y 0,006 $mg\ L^{-1}$; kaempferol = 0,0006 y 0,008 $mg\ L^{-1}$; respectivamente. Todas las muestras en estudio, apropiadamente diluidas, y las soluciones estándares se filtraron a través de membranas de 0,45 μm de diámetro de poro.

Determinación de la capacidad antioxidante in vitro en plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa*

La capacidad antioxidante (CA) in vitro fue determinada respecto del poder reductor de una muestra a través de los ensayos **FRAP** [31], y respecto a la capacidad de captación de radicales libres mediante las pruebas de **ABTS** y **DPPH** [31]. Los resultados en todos los casos se expresan en relación a la capacidad antioxidante del Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E de reconocida actividad antioxidante.

Ensayo FRAP

El método FRAP (poder antioxidante de reducción del ión férrico) se basa en la capacidad del Fe a reducirse (Fe(III) a Fe(II)) en medio acuoso (pH = 3,6). La determinación de la reducción se lleva a cabo mediante una reacción colorimétrica, en la cual el ligando TPTZ (2,4,6,-tripiridil-s-triazina) forma un complejo coloreado con Fe(II), el que se puede determinar espectrofotométricamente debido a que presenta un máximo de absorbancia en 593 nm [31]. La Figura 3 muestra la estereoquímica del complejo formado entre TPTZ y los distintos iones de hierro.

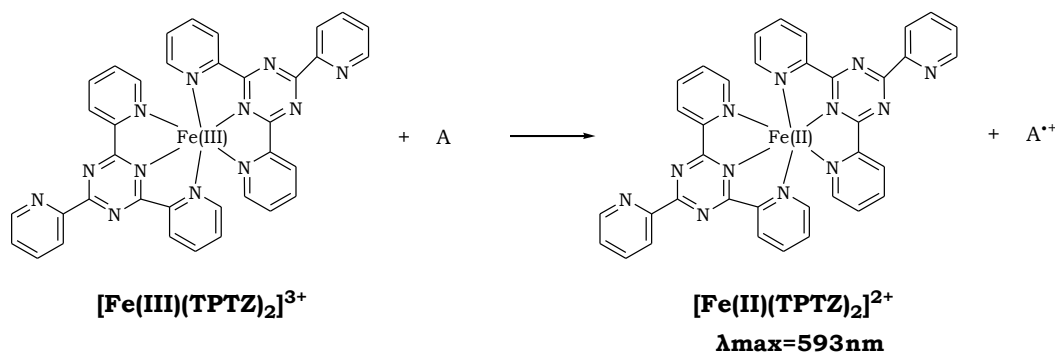


Figura 3: Reacción del ensayo FRAP donde A es un compuesto antioxidante con capacidad reductora. Figura tomada del trabajo de tesis doctoral: "De la uva al vino: estudio de las propiedades antioxidantes y dilucidación de los mecanismos de acción de sus compuestos polifenólicos" de la doctora Mariana Lingua (2016), FCQ-UNC.

Para la determinación de la capacidad reductora se colocaron 3 mL de reactivo de trabajo en un tubo de Khan, 100 μL de muestra apropiadamente diluida. Luego de 6 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se leyó la absorbancia de la solución a 593 nm. Al reactivo de trabajo es necesario prepararlo diariamente de la siguiente manera: se mezclan en una proporción 10:1:1 buffer acético/acetato 300 mM a pH = 3,6, TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM. La cuantificación de polifenoles se logra debido a que el aumento de la concentración de *Fe(II) – TPTZ* es directamente dependiente de la concentración de antioxidantes presentes en la muestra.

Ensayo ABTS

Con el ensayo ABTS se mide la capacidad de un determinado compuesto para captar el radical 2,2'-azino-bis(3-etilenbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{*+}), este es un radical catiónico coloreado que al reaccionar con los polifenoles se convierte a un producto incoloro. Este radical posee una coloración verde-azulada y presenta un

espectro de absorción característico, con máximos a 414, 645, 734 y 815 nm. Químicamente es muy estable y soluble en medios acuosos y etanólicos, permitiendo el estudio de antioxidantes tanto hidrosolubles como liposolubles [31]. La Figura 4 muestra la esteoquímica de la formación del radical $ABTS^{*+}$ y cómo este reacciona con un compuesto polifenólico que tenga capacidad para captar radicales.

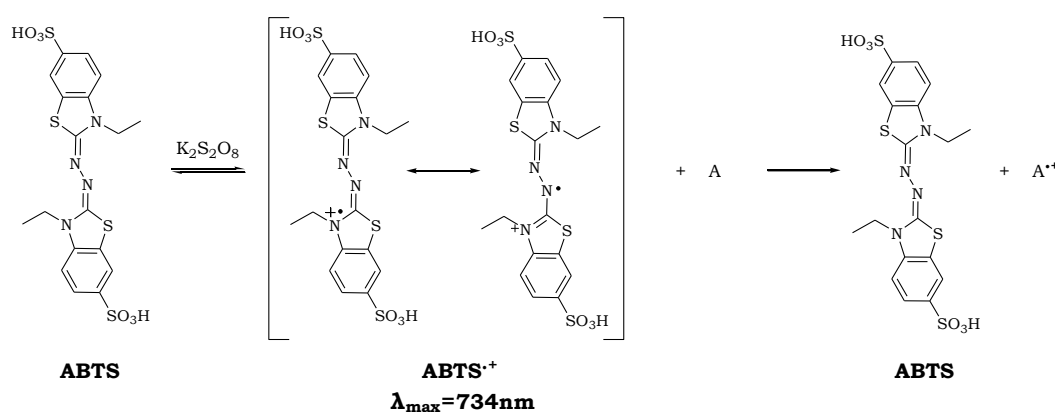


Figura 4: Reacción del ensayo ABTS donde A es un compuesto antioxidante con capacidad para captar radicales. Figura tomada del trabajo de tesis doctoral: "De la uva al vino: estudio de las propiedades antioxidantes y dilucidación de los mecanismos de acción de sus compuestos polifenólicos" de la doctora Mariana Lingua (2016), FCQ-UNC.

Para la metodología utilizada en este trabajo se genera directamente el $ABTS^{*+}$ a través de la reacción de ABTS con persulfato de potasio. En un tubo de Khan se colocan 3 mL de reactivo de trabajo ($ABTS^{*+}$) y se agregan 100 μ L de muestra apropiadamente diluida. Luego de 4 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se lee la absorbancia de la solución a 734 nm. Es necesario preparar diariamente el reactivo de trabajo ($ABTS^{*+}$) mezclando 10 mL de una solución de ABTS 7 mM en agua ultra pura, con 6,7 mg de $K_2S_2O_8$. A esta solución se la protegió de la luz y se la dejó estabilizar durante 12-16 h a temperatura ambiente. Luego se diluye el $ABTS^{*+}$ generado con metanol hasta una absorbancia de $0,80 \pm 0,02$, a una

longitud de onda de 734 nm y a una temperatura de 25 °C. La cuantificación de polifenoles se obtiene mediante la disminución de la concentración de *ABTS*^{•+} ya que es directamente proporcional a la concentración de antioxidantes presentes en la muestra.

Ensayo DPPH

Este procedimiento mide la capacidad de diferentes compuestos antioxidantes para captar radicales libres, para ello se utiliza el radical (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (*DPPH*[•]). El *DPPH*[•] es un radical coloreado que se convierte en un producto sin color luego de reaccionar con los polifenoles. Es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables y disponibles comercialmente, por lo que no requiere ser generado previo al ensayo. Éste posee una coloración púrpura intensa y presenta un espectro de absorción característico, con un máximo a 515 nm [31]. La Figura 5 muestra la estequímica del radical *DPPH*[•] y cómo reacciona frente a un compuesto antioxidante.

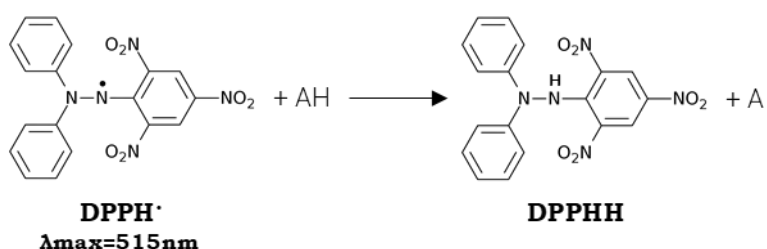


Figura 5: Reacción del ensayo DPPH donde AH es un compuesto antioxidante con capacidad de donar un radical H. Figura tomada del trabajo de tesis doctoral: "De la uva al vino: estudio de las propiedades antioxidantes y dilucidación de los mecanismos de acción de sus compuestos polifenólicos" de la doctora Mariana Lingua (2016), FCQ-UNC.

Para este estudio se agregan en un tubo de Khan 3 mL del reactivo de trabajo y 100 μL de muestra apropiadamente diluida, luego de 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se lee la absorbancia de la solución a 515 nm. Es necesario preparar diariamente el reactivo de trabajo con una solución de 60 μM del *DPPH** en metanol protegida de la luz. La cuantificación de polifenoles se logra debido a que la disminución de la concentración de *DPPH** es directamente proporcional a la concentración de antioxidantes presentes en la muestra.

Resultados y discusión

Estudios del efecto del Cr(VI) respecto a la acumulación en suelo y bioacumulación en plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa*

Para estudiar la acumulación de Cr que realizan las plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa*, fue necesario, en una primera instancia conocer el comportamiento del Cr(VI) en el suelo en estudio.

Para este ensayo se utilizó tierra negra, adquirida comercialmente. Se realizaron 3 tratamientos diferentes, un grupo de macetas ($n = 3$) fueron regadas con un volumen de 25 mL, día de por medio, con 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, otro grupo ($n = 3$) fue regado con 25 mL de una solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,5 mg L^{-1} , y un último grupo que representaba el tratamiento control que solo fueron regadas con agua MQ.

Las soluciones de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fueron preparadas diariamente y debido a que las soluciones fueron realizadas con esta sal que tiene dos átomos de Cr por molécula, es que los resultados se presentan con el doble de concentración del metal.

Se procedió a recolectar muestras de suelo los días: 3, 7, 15 y 30, para lo cual se tomaron 10 g de suelo, tratando de extraer una muestra lo más representativa

posible, extrayendo una porción cilíndrica que contuviese una fracción superficial y partes de la profundidad.

Con el fin de comparar los valores determinados mediante ICP-MS para esta prueba se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) a dos vías teniendo en cuenta la interacción de los factores. Las variables analizadas fueron la concentración de Cr utilizada para regar las plantas ([Cr(VI)] riego) y los días de exposición (días). La Tabla 1 resume la información obtenida para dicho análisis mediante el software Infostat versión 2016.

Del cuadro del análisis de la varianza que se muestra en la Tabla 1, puede observarse que el modelo lineal empleado tiene un p-valor $< 0,0001$, como éste es menor a 0,05 (nivel de significancia utilizado para todos los estudios) indica que el modelo es estadísticamente significativo. Los p-valores tan pequeños para ambos factores dan indicio de que los efectos de éstos no son nulos ante la respuesta estudiada. Mientras que el p-valor menor a 0,05 para la interacción entre ambos factores, representado como [Cr(VI)] riego * días, indica que estos factores no actúan independientemente uno respecto al otro.

Posterior al ANOVA, se realizó el test DGC para las comparaciones de las medias, este procedimiento permite contrastar los valores de las medias utilizando una técnica multivariada que realiza comparaciones múltiples, en lugar de a pares, evitando conclusiones erróneas, sobre todo, al tener numerosos tratamientos [32]. Como resultado se muestra en la Tabla 1 una última columna con letras diferentes para las medias que presentan diferencia estadísticamente significativa. Los resultados de este análisis, en relación a la comparación de las medias para la variable [Cr(VI)] riego, muestran que existen diferencias estadísticamente

significativas con un 95% de confianza entre los tres niveles: control ([Cr(VI)] riego = 0), $25 \mu\text{g L}^{-1}$ y 1 mg L^{-1} , asignándose las letras A, B y C respectivamente.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
[Cr _{total}] Suelo	30	0,98	0,97	4,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	11	0,006	96,9	<0,0001
[Cr(VI)] riego	0,05	2	0,025	410	<0,0001
Día	0,006	3	0,002	30,9	<0,0001
Día*[Cr(VI)] riego	0,01	6	0,002	39,2	<0,0001
Error	0,001	18	6,00E-05		
Total	0,07	29			

Test: DGC

[Cr(VI)] riego	Medias	n	E.E.	
0	0,13	10	0,003	A
$25 \mu\text{g L}^{-1}$	0,15	11	0,002	B
1 mg L^{-1}	0,23	9	0,003	C

Test :DGC

Día	Medias	n	E.E.	
3	0,15	8	0,003	A
7	0,16	7	0,003	B
30	0,18	7	0,003	C
15	0,19	8	0,003	C

Test: DGC

[Cr(VI)] riego	Día	Medias	n	E.E.	
0	30	0,12	2	0,005	A
0	15	0,13	3	0,004	A
0	7	0,13	3	0,004	A
0	3	0,14	2	0,005	A
25	3	0,15	3	0,004	B
25	15	0,15	3	0,004	B
25	30	0,15	3	0,004	B
25	7	0,16	2	0,005	B
1	3	0,18	3	0,004	C
1	7	0,19	2	0,005	C
1	30	0,27	2	0,005	D
1	15	0,28	2	0,005	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 1: Análisis de la varianza para la concentración de Cr en suelo.

Al comparar las medias del factor *días* de exposición, puede observarse en la Tabla 1 que existen diferencias significativas entre los dos días 3, 7 y 15, pero no entre las medias para los días 15 y 30, siendo estas muestras de tierra las que presentan mayor concentración de Cr biodisponible.

A partir de la comparación de las medias respecto a la interacción entre ambos factores se puede llegar a las siguientes conclusiones: la concentración de Cr en las tierras utilizadas como control son estadísticamente iguales al compararlas respecto a los diferentes días de exposición. Tampoco existe diferencia significativa entre las tierras regadas con $25 \mu g L^{-1}$, frente a los distintos días de muestreo. Lo destacable son los suelos regados con $1 mg L^{-1}$ que presentan diferencia significativa para los diferentes días de regado. Los suelos regados por 3 y 7 días presentan una menor concentración de Cr biodisponible que los expuestos durante 15 ó 30 días.

En la Figura 6 se muestra la concentración de Cr biodisponible (unido lábilmemente) en el suelo con los distintos tratamientos mencionados anteriormente. Los distintos colores: fucsia, bordó, verde y azul representan los días de muestreo, 3, 7, 15 y 30 respectivamente. Es importante destacar que las barras con letra común no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

En la Figura 6 puede observarse que hay un aumento en la concentración de Cr biodisponible con el incremento de la concentración con las que fueron regadas las macetas. Sin embargo, los suelos regados con $25 \mu g L^{-1}$, no presentan diferencias significativas respecto a los diferentes días de exposición. Una posible causa a este hecho es que el Cr al formar diferentes complejos estables con los grupos funcionales de la materia orgánica del suelo [2], harían que la fracción biodisponible no cambie significativamente.

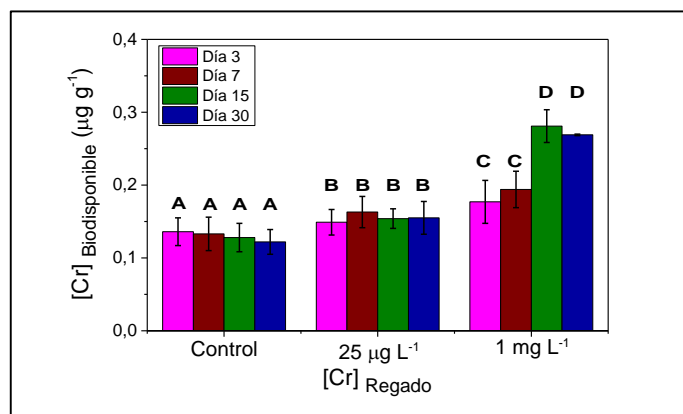


Figura 6: Concentración de Cr biodisponible en suelo en función de la [Cr(VI)] con la que fueron regadas las macetas. Los distintos colores representan los días que fueron regadas: 3; 7; 15 y 30, en violeta, bordó, verde y azul, respectivamente. Se muestra el promedio de los valores determinados y su intervalo de confianza. Barras con letra común no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$).

Teniendo en cuenta que una de las principales vías de entrada de los metales a las plantas es el suelo [1] y conociendo la biodisponibilidad del Cr frente al regado con distintas concentraciones del metal en cuestión, además de haber realizado el estudio de la influencia de los días de regado, es que se planificó la exposición de las plantas a Cr(VI).

Se decidió realizar exposiciones a 25, 100 y 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, la primera es una concentración baja, la concentración de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ se eligió debido a que este es el valor máximo permitido para riego por el *Ministerio de ambiente y desarrollo sustentable de la Nación Argentina* (Decreto 831/93). Por último, la concentración más alta (250 $\mu\text{g L}^{-1}$) supera ampliamente el nivel máximo permitido para agua de riego por la legislación vigente. Todas las macetas fueron regadas con 25 mL de la solución correspondiente y día de por medio. Las tres soluciones fueron preparadas el mismo día en que se realizaba el riego.

El ensayo fue planificado para realizar las exposiciones por 30 días, tomando muestras a los días 15 y 30 respectivamente. En la Figura 7 se muestran las imágenes fotográficas de las plantas expuestas a distintas concentraciones luego de 20 días de exposición con Cr(VI).



Figura 7: Fotografía de plantas de rúcula *Eruca sativa*, regadas durante 20 días con distintas concentraciones de Cr(VI): 25, 100 y 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, la planta control fue regada siempre con agua miliQ.

Es destacable, de la Figura 7, el marcado deterioro que presentaron las plantas regadas con las concentraciones más altas de Cr ($250 \mu\text{g L}^{-1}$), lo que da un indicio del efecto tóxico que este elemento les produce [33]. Debido a esto, se decidió finalizar el ensayo a las 3 semanas (21 días) de exposición, para no correr el riesgo de perder el material de estudio al finalizar los 30 días planificados.

En la Figura 8 se presentan las imágenes fotográficas de las plantas el primer día de exposición y luego de 15 y 21 días, para las distintas concentraciones de Cr(VI) con las que fueron regadas.

Pueden notarse en las fotografías de la Figura 8 algunas diferencias morfológicas en las plantas, por ejemplo, el largo del tallo que aumentó luego de los 15 días, para todos los tratamientos, la cantidad de hojas que también aumentó con el pasar de los días. Para el día 21 puede notarse un deterioro en el aspecto general de las plantas regadas con $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI) evidenciándose la presencia de algunas

hojas amarillas y los tallos más débiles. Estas diferencias de tamaño pueden deberse a que grandes cantidades de Cr acumuladas por las plantas logran reducir el crecimiento de las raíces y brotes [34].



Figura 8: Imagen fotográfica de plantas de rúcula *Eruca sativa*, a los día 1, 15 y 21 de exposición con distintas concentraciones de Cr(VI): 25, 100 y 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, la planta control fue regada siempre con agua miliQ.

Al finalizar el ensayo de exposición se analizó la fracción lábil o concentración de Cr biodisponible en el suelo en función de los distintos tratamientos (riego con concentraciones diferentes en el suelo donde crecieron las plantas). Nuevamente, para comparar los valores de concentración de Cr_{total} determinados mediante ICP-MS en este ensayo, se realizó un ANOVA a dos vías, incluyendo la interacción entre

los factores: [Cr(VI)] riego y los días de exposición, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
[Cr _{total}] Suelo	19	0,93	0,88	6,1

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,18	7	0,03	20	<0,0001
[Cr(VI)] riego	0,12	3	0,04	31	<0,0001
Día	0,02	1	0,02	15	0,0024
Día*[Cr(VI)] riego	0,01	3	0,004	2,9	0,0857
Error	0,01	11	0,001		
Total	0,19	18			

Test:DGC

[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Medias	n	E.E.	
0	0,51	5	0,02	A
25	0,56	5	0,02	B
100	0,57	4	0,02	B
250	0,72	5	0,02	C

Test:DGC

Día	Medias	n	E.E.	
21	0,56	9	0,01	A
15	0,63	10	0,01	B

Test:DGC

[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Día	Medias	n	E.E.	
0	21	0,44	3	0	A
25	21	0,55	2	0	B
100	21	0,57	2	0	B
100	15	0,58	2	0	B
25	15	0,58	3	0	B
0	15	0,58	2	0	B
250	21	0,68	2	0	C
250	15	0,76	3	0	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 2: Análisis de la varianza para la concentración de Cr en la fracción biodisponible de suelo.

Del cuadro del análisis de la varianza de la Tabla 2 se concluye que el modelo empleado es significativo (p -valor menor a 0,05). El análisis de los p -valores de los

factores muestra que éstos siempre son menores a α , lo que da indicio de un efecto estadísticamente válido. Por otra parte, las interacciones tienen un p-valor marginal que si bien no es estadísticamente significativo debe ser considerado en el modelo.

El test DGC para la comparación de las medias del factor [Cr(VI)] riego muestra que las tierras regadas con agua milliQ (control) tienen distinta concentración que las regadas con soluciones de Cr(VI). Entre las macetas regadas con distintas concentraciones, solo tiene diferencia estadísticamente significativa la expuesta a $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI). Al comparar las medias del factor días de exposición se observa que existe diferencia significativa entre los dos días 15 y 21. La comparación de las medias respecto a la interacción entre ambos factores dio como resultado que el control regado durante 21 días con agua milliQ tiene diferencia significativa, presentando una menor concentración de [Cr] respecto a todas las otras macetas. Las regadas con $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr, para ambos días no presentan diferencia significativa entre ellas y tienen la concentración más alta ($0,68$ y $0,76 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cr para las macetas regadas por 15 y 21 días, respectivamente). Las otras macetas no presentan diferencias significativas entre ellas.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos para dicho estudio. En verde están representadas las concentraciones determinadas luego de 15 días de exposición y en azul para 21 días.

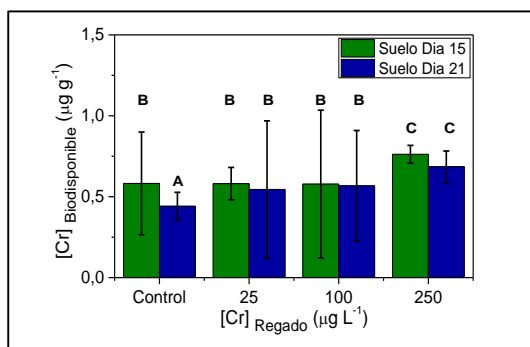


Figura 9: Concentración de Cr biodisponible en función de la [Cr(VI)] con la que fueron regadas las macetas. En verde se representan los valores obtenidos para las macetas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Se muestra el promedio de los valores determinados y su intervalo de confianza. Las barras con letra común no tienen diferencia significativa ($p > 0,05$).

En la Figura 9 se destaca la disminución en la concentración de Cr biodisponible para el control, esto podría ser atribuido al proceso de lavado que se realiza al suelo por regar las macetas solo con agua. También es notable el aumento en la fracción lábil para las macetas regadas con $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI).

Una vez conocida la fracción biodisponible de Cr en los suelos donde crecieron las plantas, se estudió la bioacumulación del metal en especie de *Eruca sativa*. La Tabla 3 resume los resultados del test de ANOVA a dos vías de las concentraciones de Cr_{total} acumulado por las plantas, determinadas por ICP-MS. En este estudio estadístico se tiene en cuenta la interacción entre los factores: [Cr(VI)] riego y los días de exposición.

El cuadro del análisis de la varianza de la Tabla 3 indica con un p-valor menor a 0,05 que tanto el modelo empleado como la contribución de los dos factores y la interacción entre ambos son estadísticamente significativos.

De la comparación de las medias del factor [Cr(VI)] riego mediante el test de comparaciones múltiples (DGC) se destaca que hay diferencia significativa entre las plantas control y las expuestas a Cr, obteniendo una concentración Cr acumulado de

2,65 $\mu\text{g g}^{-1}$ cuando fueron regadas con 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ no habiendo diferencias entre las regadas con 25 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Al comparar las medias del factor días de exposición, se denota la diferencia significativa entre los días 15 y 21.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
[Cr _{total}] Planta	24	0,86	0,79	22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15	7	2,14	14	<0,0001
[Cr(VI)] riego	10,2	3	3,41	22	<0,0001
Día	1,29	1	1,29	8,2	0,0113
Día*[Cr(VI)] riego	3,45	3	1,15	7,3	0,0027
Error	2,52	16	0,16		
Total	17,5	23			

Test:DGC

[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Medias	n	E.E.	
0	0,85	6	0,16	A
25	1,68	6	0,16	B
100	2,06	6	0,16	B
250	2,65	6	0,16	C

Test:DGC

Día	Medias	n	E.E.	
15	1,58	12	0,11	A
21	2,04	12	0,11	B

Test:DGC

[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Día	Medias	n	E.E.	
0	15	0,83	3	0,2	A
0	21	0,87	3	0,2	A
25	21	1,61	3	0,2	B
25	15	1,75	3	0,2	B
250	15	1,77	3	0,2	B
100	15	1,96	3	0,2	B
100	21	2,15	3	0,2	B
250	21	3,53	3	0,2	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 3: Análisis de la varianza para la concentración de Cr bioacumulado en plantas de rúcula *Eruca sativa*.

Las conclusiones obtenidas del test a posteriori respecto a la interacción de ambos factores mostraron que no son significativamente diferentes los controles para ambos días, pero si presentan diferencia entre las plantas controles y las expuestas a Cr(VI) (regadas con cualquier concentración durante 15 y 21 días). Respecto a las plantas expuestas al metal la única combinación de factores que mostró diferencia significativa son las plantas regadas durante 21 días con $250 \mu\text{g L}^{-1}$, presentando una mayor concentración de Cr acumulado.

La Figura 10 muestra los resultados obtenidos en este ensayo.

El gráfico de la Figura 10 resume la concentración de Cr acumulado en las plantas en función a la concentración de Cr(VI) con la que fueron regadas. En verde están representadas las concentraciones determinadas luego de 15 días de exposición y en azul para 21 días.

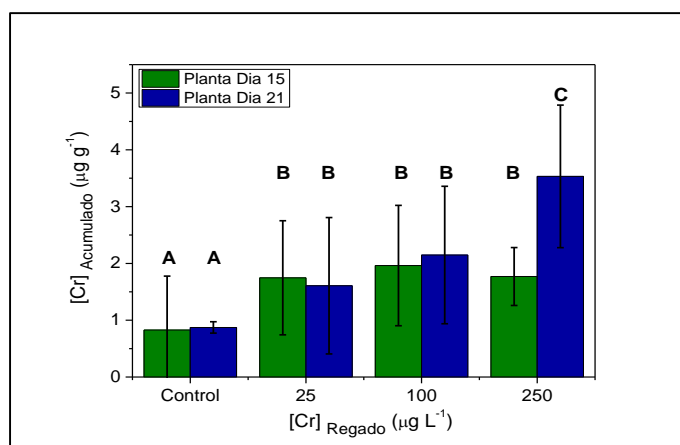


Figura 10: Concentración de Cr acumulado en función de la [Cr(VI)] con la que fueron regadas las plantas. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Se muestra el promedio de los valores determinados y su intervalo de confianza. Las barras con letra común no tienen diferencia significativa ($p > 0,05$).

Es importante destacar de la Figura 10 que todas las plantas expuestas a Cr(VI) han acumulado este elemento ya que tienen una mayor concentración que las plantas control, regadas solo con agua miliQ.

Otro detalle a remarcar es que las plantas acumularon Cr siguiendo la misma tendencia que la fracción lábil del metal presente en el suelo expuesto al mismo.

La Figura 11 muestra la comparación entre la concentración de Cr biodisponible en suelo (cuadrados rellenos) y Cr acumulado en plantas de rúcula *Eruca sativa* (círculos vacíos) en función de la concentración de Cr(VI) a la que fueron expuestas las muestras durante 15 días (verde) y 21 días (azul).

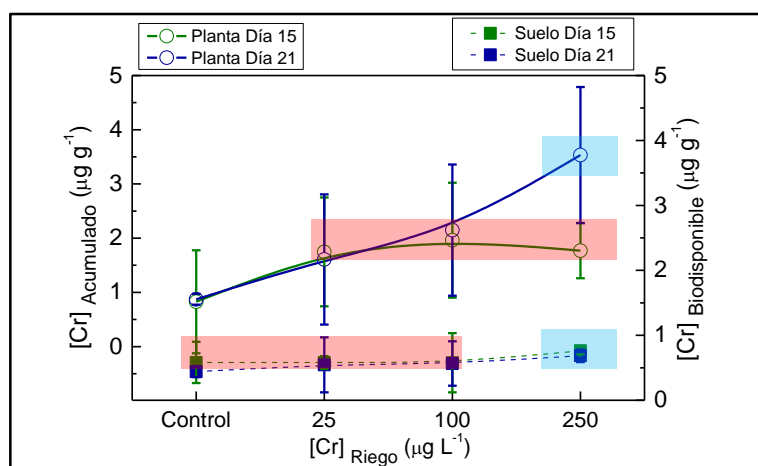


Figura 11: [Cr] biodisponible en suelo (■) y [Cr] acumulado en plantas de rúcula *Eruca sativa* (○). Los valores representados son la media y el intervalo de confianza para cada punto, expresado en µg por cada gramo de peso seco de muestra. Muestras expuestas durante 15 días (—) y durante 21 días (—). Muestras sin diferencias estadísticamente significativas en función a la concentración de regado (■) y muestras con diferencias significativas (■).

A partir del gráfico de la Figura 11 se pretende comparar la tendencia de la concentración de Cr biodisponible con la de Cr acumulado por las plantas. Los recuadros rojos agrupan las plantas y los suelos que presentan un aumento en la concentración de Cr acumulado respecto al control, tanto para 25 como para 100

$\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos días, estas muestras no presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración con las que fueron regados. Los recuadros celestes resaltan ambas muestras regadas con la mayor concentración de Cr, estos puntos presentan una concentración significativamente mayor al grupo antes mencionado.

A partir de estos resultados se puede destacar que las plantas acumularían Cr siguiendo la misma tendencia que la concentración de Cr en el suelo (metal biodisponible). Por otra parte, no se encuentran diferencias significativas entre la fracción lábil de los suelos control y los expuestos a 25 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ donde crecieron las plantas, esto podría deberse a que éstas solo acumulan el metal que se encuentra biodisponible haciendo que no difieran las concentraciones entre los suelos antes mencionados.

Estos cambios dan indicio que las plantas toman ese Cr biodisponible y lo acumulan entre sus raíces, hojas y tallos. Muchos estudios han demostrado que la bioacumulación de Cr en plantas ocurre por la inmovilización del metal en raíces, ya que esta parte de la planta es la que tendría mayor capacidad de acumulación. Se estima que la inmovilidad del metal se debe a vacuolas presentes en las células de la raíz formando parte de un sistema de protección para evitar que el Cr se transloque a las hojas y afecte al aparato fotosintético. La permanencia de Cr en las raíces inhibe la división celular y acorta la longitud total de las raíces, lo que puede provocar graves procesos de absorción de agua y nutrientes restringidos, que a su vez conducen a la disminución del crecimiento del tallo [34,35].

Después de la entrada de Cr a través de las raíces, el transporte por translocación hacia el tallo ocurre muy lentamente. En otros estudios se han encontrado

concentraciones Cr entre 10 y 100 veces mayores en raíces que en tallos y otros tejidos [36].

Si bien la translocación y acumulación de Cr dentro de la planta depende de las especies de plantas, del estado de oxidación del metal y la concentración, Zayed *et al.* demostraron que el Cr acumulado en siete de diez especies de cultivos analizados era mayor cuando las plantas crecieron en presencia de Cr(VI) que en Cr(III) [37]. Lo sorprendente de estos experimentos es que las plantas fueron expuestas a una u otra especie fue que solo se encontró Cr(III) en sus tejidos. Estos datos sugirieron que el Cr(VI) se transforma en Cr(III) principalmente dentro de las células de la raíz, pero también puede ocurrir en la parte aérea de la planta [36,37].

Estudio del potencial efecto tóxico del Cr respecto al consumo humano

La inocuidad de los alimentos ha ganado interés a nivel mundial. Los vegetales pueden acumular metales en concentraciones mayores a los niveles máximos permitidos, en particular, la absorción de Cr y la acumulación en las partes comestibles de las plantas puede provocar numerosos riesgos para la salud de los consumidores ya que las verduras se consideran como componentes esenciales de la dieta [9].

La Tabla 4 muestra los niveles máximos permitidos de Cr en muestras de agua utilizadas para riego agrícola, ($\mu\text{g L}^{-1}$), establecidos por normas de distintos países de América como México, Argentina, Brasil y Canadá [38–41].

Niveles guía: Agua para riego agrícola

México → $Cr_{total} = 1000 \mu g L^{-1}$

Argentina → $Cr_{total} = 100 \mu g L^{-1}$

Brasil → $Cr_{total} = 50 \mu g L^{-1}$

Canadá → $Cr(III) = 50 \mu g L^{-1}$ y $Cr(VI) = 4,9 \mu g L^{-1}$

Tabla 4: Concentración de Cr permitido para agua de riego agrícola.

Es importante destacar en la Tabla 4 que solo los niveles guía establecidos por Canadá hace referencia a las dos especies más comunes del Cr y restringe en un orden de magnitud la concentración permitida para la especie más tóxica (Cr(VI)).

La ingesta diaria permitida por la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA) es de $1,5 mg kg^{-1}$ de peso corporal por día para Cr(III) y $0,003 mg kg^{-1}$ de peso corporal para Cr(VI). Al promediar el peso entre hombres y mujeres se considera un peso corporal de $60 kg$, para esto, la EPA permitiría un consumo de $90 mg$ diarios de Cr(III) y $0,02 mg$ diarios de Cr(VI).

Las plantas de rúcula presentaron una concentración de Cr total de 0,10; 0,18; 0,26 y $0,39 \mu g g^{-1}$ en peso húmedo cuando éstas fueron expuesta (en $\mu g L^{-1}$) a 0 (control), 25, 100 y 250, de Cr(VI) respectivamente.

Si se considera que el peso aproximado de rúcula que se consume en una ensalada es de $100 g$, se estarían consumiendo $0,01 mg$ de Cr si las plantas estuvieran regadas con agua mili-Q, $0,02 mg$ de Cr al regarlas con $25 \mu g L^{-1}$, $0,03 mg$ y $0,04 mg$ al haber regado las plantas con $100 \mu g L^{-1}$ y $250 \mu g L^{-1}$ de Cr, respectivamente.

Al comparar los valores de ingesta diaria permitida establecidos por la EPA con la cantidad de Cr que una persona consumiría con 100 g de ensalada, las plantas regadas con 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ están dentro de los valores permitidos, pero las plantas regadas con concentraciones mayores, superan ampliamente la ingesta diaria recomendada para este elemento por la EPA si es que todo el Cr presente en la planta es Cr(VI), en cambio si todo el Cr presente en la planta es Cr(III) no lo superaría.

Estudio del estrés oxidativo y de la capacidad antioxidante frente a la exposición de plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa* a Cr(VI)

Determinación de Compuestos Polifenólicos Totales

Debido a la importancia de los polifenoles respecto a la capacidad para proteger a los constituyentes celulares frente al daño oxidativo generado por la sobreproducción de radicales libres [19], resulta necesario y de gran interés estudiar el cambio de la concentración de polifenoles totales (PT) respecto a la concentración de Cr(VI) con la que fueron regadas las plantas de rúcula.

La Tabla 5 resume los resultados del ANOVA a dos vías para el estudio de PT, teniendo en cuenta la interacción entre los factores: [Cr(VI)] riego y los días de exposición.

A partir del cuadro del análisis de la varianza de la Tabla 5 se concluye que el modelo matemático empleado es estadísticamente significativo como también lo son la contribución de ambos factores y la interacción entre ellos, debido a que presentan p-valores menores a 0,05.

De la comparación de las medias del factor [Cr(VI)] riego mediante el test de comparaciones múltiples (DGC) se destaca que no existe diferencia significativa entre las plantas utilizadas como control y las regadas con 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Las plantas

regadas con $250 \mu\text{g L}^{-1}$ tienen el menor valor de PT y tienen diferencia significativa con las expuestas a $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Polifenoles Totales	29	0,896	0,862	7,2

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	94,6	7	13,52	26	<0,0001
[Cr(VI)] riego	29,9	3	9,955	19	<0,0001
Día	25,6	1	25,64	49	<0,0001
[Cr(VI)] riego*Día	41,1	3	13,72	26	<0,0001
Error	10,9	21	0,521		
Total	106	28			

Test:DGC

[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Medias	n	E.E.	
250	8,57	9	0,242	A
100	10	6	0,295	B
0	10,7	8	0,255	C
25	11,2	6	0,313	C

Test:DGC

Día	Medias	n	E.E.	
21	9,15	13	0,208	A
15	11,1	16	0,183	B

Test:DGC

[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Día	Medias	n	E.E.	
250	21	7,074	4	0,4	A
100	21	7,248	3	0,4	A
250	15	10,069	5	0,3	B
0	21	10,241	4	0,4	B
25	15	10,444	4	0,4	B
0	15	11,079	4	0,4	B
25	21	12,045	2	0,5	C
100	15	12,805	3	0,4	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 5: Análisis de la varianza para la concentración de PT en plantas de rúcula *Eruca sativa*.

Al comparar las medias del factor días de exposición, se denota la diferencia significativa entre los días 15 y 21. Obteniendo, en promedio, una disminución de los valores de PT al exponerlas por mayor tiempo.

El test a posteriori para la interacción entre ambos factores muestra que las plantas regadas durante 21 días con las dos concentraciones mayores, presentan la menor concentración de PT. La concentración mayor de PT fue obtenida para las plantas expuestas durante 15 días a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ y durante 21 días a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La Figura 12 muestra la concentración de PT en función de la concentración de Cr(VI) con las que fueron regadas las plantas, expresados en mg de equivalente de ácido gálico (EAG). Las plantas fueron expuestas durante 15 y 21 días y se representan en color verde y azul respectivamente. Las barras con letras diferentes presentan diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores.

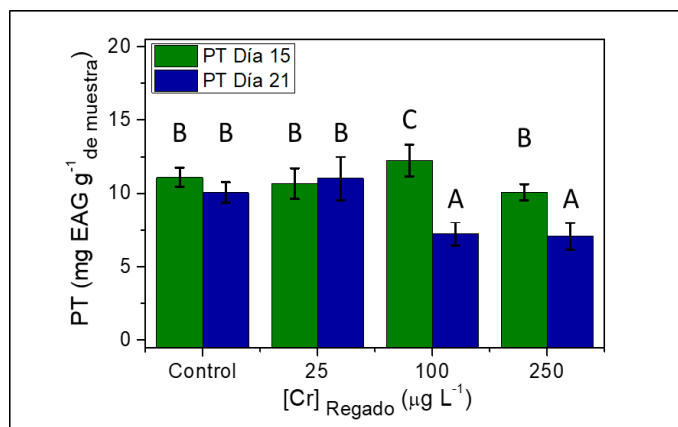


Figura 12: Contenido de Polifenoles Totales (PT) en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a distintas concentraciones de Cr(VI), el contenido de PT está expresado en mg GAE por cada gramo de peso seco de la planta. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Se muestra el promedio de los valores determinados y su intervalo de confianza. Las barras con letra común no tienen diferencia significativa ($p > 0,05$).

Se puede destacar del gráfico que se muestra en la Figura 12 el aumento de PT cuando las plantas fueron expuestas a Cr(VI) durante 15 días con una concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Por otra parte, las plantas expuestas a la misma concentración por 21 días presentaron un decaimiento en la concentración de éstos. Otro decaimiento notorio en la concentración de PT fue en las plantas expuestas a la concentración más alta ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) por 15 días, respecto a las regadas con $100 \mu\text{g L}^{-1}$. El aumento de PT es reconocido como un mecanismo de protección de las plantas frente al estrés oxidativo que le genera la acumulación de Cr [20]. El posterior decaimiento de PT podría interpretarse como una situación donde las plantas son incapaces de defenderse frente al estrés ambiental al que estuvieron expuestas y, por lo tanto, disminuyen sus sistemas de defensa.

Determinación del Perfil de polifenoles: Identificación de compuestos

El perfil de polifenoles fue examinado detalladamente realizando un estudio cuantitativo mediante HPLC respecto a valores estándares conocidos. De todos los polifenoles mencionados en bibliografía, se detectaron y cuantificaron los de la familia de flavonoides, diversos estudios han demostrado que las plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa* contienen niveles significativos de esta familia de polifenoles [22]. Se estudiaron tanto los compuestos poliglicosilados derivados de las agliconas: kaempferol, quercetina e isorhamnetin, como las mismas agliconas.

La Figura 13 muestra de manera esquemática la estructura molecular de la familia de flavonoides. Todos comparten una estructura química común, el 2-fenil-benzopirano, conformada por un esqueleto C6-C3-C6, la cual consiste en 2 anillos aromáticos (A y B) unidos por 3 átomos de carbono que forman un heterocíclico oxigenado (anillo C). Las sustituciones en la posición R1 del ciclo B dan lugar a los

distintos flavonoles y la glicosilación de estos aglicones ocurre exclusivamente por esterificación en la posición 3 del anillo C, en la figura está resaltado como R3.

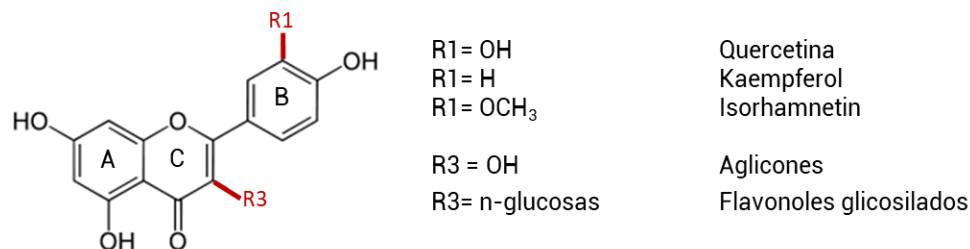


Figura 13: Esquema molecular de los compuestos flavonoles estudiados.

Se logró identificar un total de 16 compuestos derivados de quercetina, kaempferol e isorhamnetina. Para la identificación de estos compuestos es necesario tener en cuenta el tiempo de retención, masa exacta, espectros MS/MS, comparados a su vez con compuestos descriptos en la literatura y con estándares de referencia. Del total de los compuestos poliglicosados, 7 son derivados del kaempferol, 6 de la quercetina y 3 de la isorhamnetina.

La Tabla 6 resume los compuestos identificados, el tiempo de retención (Tr), la fórmula molecular, la masa teórica ([M]⁻ teórico), masa experimental ([M]⁻ experimental), la diferencia entre masa teórica y experimental (Error) y los fragmentos (MS/MS) que permitieron identificar a dichos compuestos.

Los derivados glucosídicos del kaempferol, quercetina e isorhamnetina se lograron identificar ya que, en los patrones de fragmentación, generalmente se observa la pérdida sucesiva de 162 unidades de masa. Esta disminución en la masa molecular indica la pérdida de una hexosa en el carbono 3 del anillo C [42], obteniéndose como fragmento principal el aglicón correspondiente.

Los compuestos 14, 15 y 16 presentan un ion precursor de 301, 285 y 315 unidades de masa respectivamente. Estos iones corresponden a los aglicones quercetina (14), kaempferol (15) e isorhamnetina (16), los cuales se identificaron por comparación con el tiempo de retención y características espectrales (UV-VIS, MS y MS/MS) de los estándares correspondientes determinados en las mismas condiciones analíticas para quercetina y kaempferol. Para el caso de isorhamnetina se identificó por su masa exacta y patrón de fragmentación.

Los compuestos 7 y 13 fueron identificados como derivados de isorhamnetina, luego de dos pérdidas consecutivas de 162 unidades de masa para el compuesto 7 y una para el 13, llegando a una masa final de 315 correspondiente al aglicón. Esta información permitió identificarlos como isorhamnetin diglucósido e isorhamnetin glucósido respectivamente.

Los compuestos 2, 3, 4, 6, 11 y 12 presentaron perdidas sucesivas hasta lograr una masa final de 285, llegando así al correspondiente aglicón identificado como kaempferol.

El resto de los compuestos (1, 5, 8, y 9) presentaron sucesivas perdidas hasta alcanzar una masa de 301, correspondiente al aglicón identificado como quercetina.

Nº	Compuesto	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M] ⁺ teórico (m/z)	[M] ⁺ experimental (m/z)	Error (ppm)	Fragmentos MS/MS (m/z)
1	Quercetin triglucósido	12,4	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₂	787,1938	787,1953	1,8	625, 463
2	Kaempferol triglucósido	14,9	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	771, 1989	771,1999	-1,3	609, 447, 285
3	Kaempferol triglucósido (isómero)	15,5	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	771,1989	771,2027	-4,8	609, 447, 285
4	Kaempferol diglucósido	18,3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461	609,1499	6,2	447, 285
5	Quercetin diglucósido	18,7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,141	625,1435	-4,0	463, 301
6	Kaempferol diglucósido (isómero)	18,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461	609,1487	-4,3	447, 285
7	Isorhamnetin diglucósido	19,4	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	639,1567	639,1601	5,4	477, 315
8	Quercetin diglucósido sinapoyl glucósido	21,5	C ₄₄ H ₅₀ O ₂₆	993,2518	993,2607	9	831, 463, 301
9	Quercetin glucósido	22,6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	463,0888	1,2	301
10	Quercetin glucósido sinapoyl glucósido	23,9	C ₃₈ H ₄₀ O ₂₁	831,1989	831,2052	-7,5	463, 301
11	Kaempferol glucósido sinapoyl glucósido	24	C ₃₈ H ₄₀ O ₂₀	815,204	815,2128	10,8	653, 447, 285
12	Kaempferol glucósido	24,3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0933	447,0938	-1,2	284
13	Isorhamnetin glucósido	24,4	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1038	477,1046	-1,5	314
14	Quercetina	27,2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0354	301,0353	-0,3	178
15	Kaempferol	31	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	285,0411	-2,3	
16	Isorhamnetina	30,8	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315,0510	315,0522	3,8	300

Tabla 6: Datos cromatográficos y espectrales de los polifenoles identificados en las muestras estudiadas

Cuantificación de los compuestos polifenólicos

Una vez identificados los compuestos, los mismos fueron cuantificados teniendo en cuenta la curva de calibración obtenida con los estándares de los correspondientes aglicones.

Este ensayo se realizó con el fin de conocer si había cambios en las concentraciones de los mismos al exponer durante 15 y 21 días a las plantas de rúcula a diferentes concentraciones de Cr(VI). Al realizar el ANOVA para los distintos compuestos se encontró un grupo de flavonoles que no presentan diferencia estadísticamente significativa frente a los distintos factores ([Cr(VI)] riego y día de exposición) y otros que sí.

La Tabla 7 resume los valores medios con su desviación estándar para cada uno de los compuestos que no presentan diferencias estadísticamente significativas en los valores de concentración.

Se puede interpretar que estos compuestos no son utilizados por la planta como mecanismo de desintoxicación frente al Cr, eliminando especies de ROS, dando indicio a que existen otro tipos de compuestos o mecanismos que previenen el daño oxidativo [43].

El grupo de compuestos fenólicos que presentan diferencias significativas respecto a los distintos factores se resumen en la Tabla 8, donde se muestran los coeficientes de determinación y de determinación ajustados (R^2 y R_{aj}^2) y los factores que fueron significativos para el modelo estudiado mediante el ANOVA.

EL kaempferol, kaempferol glucósido, quercetin glucósido y quercetin triglucósido solo presentan diferencia significativa respecto a los días de exposición, teniendo una mayor concentración de los mismos cuando las plantas

fueron cosechadas a los 15 días de exposición que las que fueron cosechadas luego de 21 días. Para este grupo de flavonoles el factor [Cr(VI)] riego no es significativo para el modelo, mostrando no tener diferencia entre las distintas concentraciones.

La Figura 14 muestra la concentración de quercetin triglucósido (QTG) determinada en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a distintas concentraciones de Cr(VI) durante 15 días (verde) y 21 días (azul).

Si bien, a partir del ANOVA se concluyó que solo es significativo el factor de los días de exposición (resultado expuesto en la Tabla 8), es posible diferenciar las plantas según la [Cr(VI)] riego ya que la interacción entre ambos factores (días de exposición y [Cr(VI)] riego) presenta un p-valor marginal.

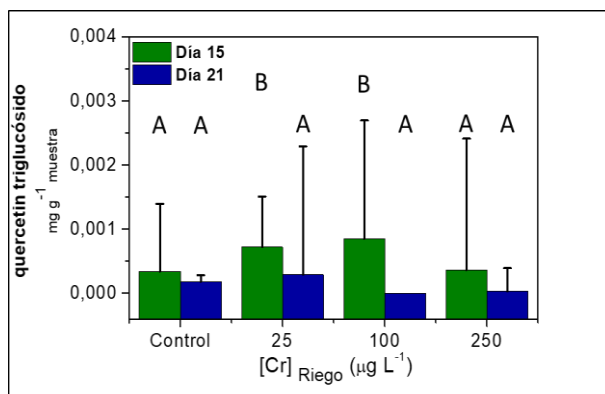


Figura 14: Concentración de quercetin triglucósido determinado en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a Cr(VI). Los valores representados son la media y el intervalo de confianza para cada punto, expresado en mg por cada gramo de peso seco de la planta. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Las barras con letra común no tienen diferencia significativa ($p > 0,05$).

Lo destacable del gráfico que se muestra en la Figura 14 es el aumento de la concentración de QTG en las plantas que fueron expuestas durante 15 días a 25

y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI). Como se expuso con anterioridad, en bibliografía se ha explicado que el aumento de este tipo de metabolitos se produce como sistema de defensa frente al estrés oxidativo producido en plantas debido al ambiente al que están expuestas [20,22,43].

Debido a que las plantas regadas con Cr(VI) expuestas durante 15 días a 25 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ muestran niveles más altos de QTG es posible considerar que estas condiciones inducen a un estrés oxidativo y en estos ambientes, la planta, aún puede defenderse respecto al incremento de las ROS inducidos por la exposición al metal. Por otra parte, al ser regadas con el valor de concentración mayor ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) o durante más tiempo (21 días) produce una disminución en la concentración de este polifenol, lo que da idea que la planta ya no puede defenderse frente a este ataque. Este comportamiento es conocido como efecto hormético, el cual explica que a bajas dosis de un metal se estimula la producción de un dado metabolismo, pero a altos niveles se inhibe. Este comportamiento es característico del Cr pero depende fuertemente de la especie que esté en estudio [9].

Día	15				21			
	[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)				[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
Compuesto ($\times 10^{-1} \mu\text{g g}^{-1}$)	0	25	100	250	0	25	100	250
Isorhamnetina	$0,04 \pm 0,02$	$0,011 \pm 0,002$	$0,01 \pm 0,002$	$0,02 \pm 0,01$	$0,002 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,002$	$0,005 \pm 0,003$	$0,04 \pm 0,02$
Isorhamnetin diglucósido	$0,9 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,01$	$0,5 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,7$	$0,10 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,3$
Isorhamnetin glucósido	$0,05 \pm 0,03$	$0,065 \pm 0,002$	$0,08 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,09$	$0,03 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,03$
Quercetin diglucósido	0	0	$0,006 \pm 0,002$	0	0	$0,006 \pm 0,002$	0	$0,011 \pm 0,006$
Kaempferol glucósido	$3,1 \pm 0,8$	3 ± 1	$(2,0 \pm 1,0) \times 10^1$	$3,5 \pm 0,4$	2 ± 1	$2,4 \pm 0,3$	2 ± 1	2 ± 1
Quercetina	$0,05 \pm 0,02$	$0,012 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,07$	$0,019 \pm 0,009$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$

Tabla 7: Compuestos polifenólicos que no presentan diferencias significativas al estudiarlos mediante ANOVA respecto a los factores [Cr(VI)] riego y Día de exposición.

Variable	R^2	R^2_{adj}	Términos Significativos
Kaempferol	0,69	0,43	día
Quercetin glucósido	0,69	0,41	día
Quercetin triglucósido	0,82	0,67	día
Kaempferol glucósido	0,71	0,45	día
Quercetin glucósido sinapoyl glucósido	0,8	0,62	día- [Cr(VI)] riego
Quercetin diglucósido sinapoyl glucósido	0,87	0,75	día- [Cr(VI)] riego
Kaempferol triglucósido (isómero)	0,89	0,8	día- [Cr(VI)] riego- día*[Cr(VI)] riego
Kaempferol triglucósido	0,84	0,7	día- [Cr(VI)] riego- día*[Cr(VI)] riego

Tabla 8: Compuestos polifenólicos que presentan diferencias significativas al estudiarlos mediante ANOVA respecto a los factores [Cr(VI)] riego y Día de exposición.

Los isómeros de Kaempferol triglucósido presentan el mismo comportamiento entre ellos. El modelo utilizado en el análisis de la varianza tiene en cuenta tanto [Cr(VI)] riego como los días de exposición y la interacción de estos factores. Al comparar las respuestas obtenidas respecto a los días de exposición, presentan una media de concentración más baja para las plantas expuestas durante 21 días que las expuestas durante 15 días. Si solo se tiene en cuenta el factor [Cr(VI)] riego, las plantas utilizadas como controles tienen diferencia significativa respecto a las regadas con Cr, logrando una mayor concentración. Cuando se estudia la interacción entre ambos factores, solo las plantas controles ($0 \mu\text{g L}^{-1}$) regadas durante 15 días tienen diferencia significativa con el resto mostrando una mayor concentración de estos compuestos. Esto podría estar significando que la exposición con Cr(VI) inhibe la síntesis de estos compuestos o que los isómeros de Kaempferol triglucósido se están oxidando o destruyendo como consecuencia del estrés que produce el metal.

El ANOVA de quercetin glucósido sinapoyl glucósido y quercetin diglucósido sinapoyl glucósido tiene en cuenta ambos factores para el modelo, ya que éstos presentan diferencias significativas. Respecto al factor días de exposición tienen la misma tendencia que los compuestos mencionados anteriormente. Al compararlos respecto al factor [Cr(VI)] riego se observó que las plantas regadas con $25 \mu\text{g L}^{-1}$ presentaron mayor concentración que las control y las regadas con 100 y $250 \mu\text{g L}^{-1}$.

En la Figura 15 se muestra la concentración de quercetin glucósido sinapoyl glucósido (QGSg) determinada en plantas de rúcula *Eruca sativa* expuestas a distintas concentraciones de Cr(VI) durante 15 días (verde) y 21 días (azul).

Es destacable del gráfico presentado en la Figura 15 el decaimiento de los valores de la concentración de QGSG en las plantas que fueron expuestas durante 21 días a 100 y 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. La disminución de la [QGSG] al regar las plantas con altas [Cr(VI)] y exponerlas por tres semanas puede interpretarse como un decaimiento en el sistema de defensa de las mismas.

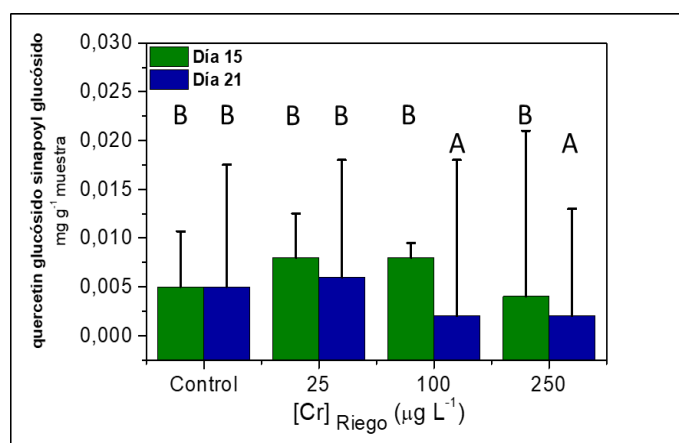


Figura 15: Concentración de quercetin glucósido sinapoyl glucósido determinados en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a Cr(VI). Los valores representados son la media y el intervalo de confianza para cada punto, expresado en mg por cada gramo de peso seco de la planta. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Las barras con letra común no tienen diferencia significativa ($p > 0,05$).

La Figura 16 muestra la comparación entre la [QGSG] (círculos llenos) y PT (cuadrados vacíos) en función de la concentración de Cr(VI) con las que fueron regadas las plantas durante 15 días (verde) y 21 días (azul).

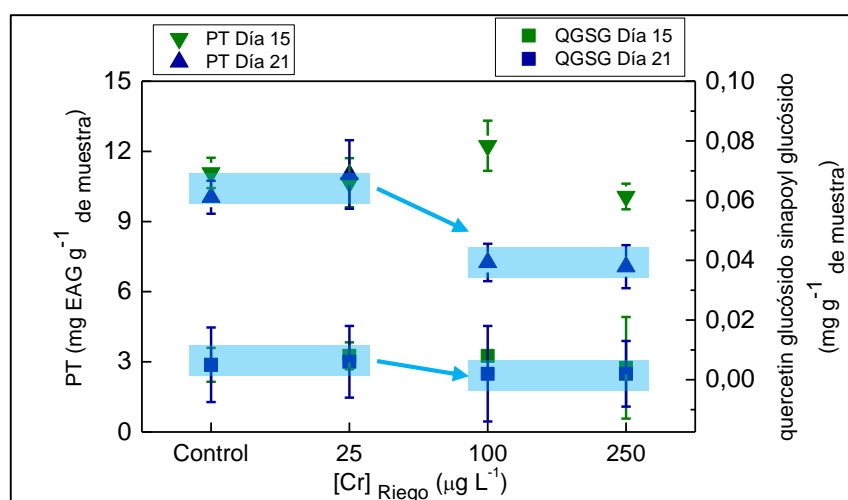


Figura 16: [QSGG] y [PT] determinados en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a Cr(VI). Los valores representados son la media y el intervalo de confianza para cada punto, expresado en mg por cada gramo de peso seco de la planta. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días.

El gráfico de la Figura 16 compara la tendencia de PT con la [QSGG], se puede destacar que el comportamiento de PT es el mismo que el del flavonol en cuestión. Se determinó una disminución en la concentración tanto para PT como QSGG frente a la exposición a Cr(VI) al regar las plantas con 100 y 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante 21 días. Este decaimiento, tanto en PT como en QSGG, da indicio del fuerte daño que produce el estrés oxidativo a las plantas. De manera general, los decaimientos en la concentración de este tipo de compuestos antioxidantes podrían no ejercer un efecto protector frente al estrés que se le produce al exponer las plantas durante tres semanas a las concentraciones más altas de Cr(VI) [33].

Determinación de la Capacidad Antioxidante in vitro

En general, la capacidad antioxidante de los polifenoles se puede estudiar a partir de distintas propiedades, como las redox o las de captar radicales libres, entre otras. Estos compuestos pueden actuar como: agentes reductores, donadores de hidrógeno, captadores de radicales libres y/o quelantes de metales, así evitan la oxidación de componentes celulares ya que, de esta manera, interfieren en la propagación de reacciones en cadena de radicales libres [9].

En este caso se realizaron tres ensayos para determinar la actividad antioxidante de los polifenoles. El ensayo de FRAP que determina la capacidad de los polifenoles a actuar como agentes reductores. Los ensayos de ABTS y DPPH determinan la capacidad de captar radicales libres, mediante distintos mecanismos.

El ANOVA a dos vías realizado para los datos obtenidos en el estudio del poder reductor de los polifenoles, determinado mediante FRAP, se muestra en la Tabla 9. El análisis se realizó teniendo en cuenta la interacción entre los factores: [Cr(VI)] riego y los días de exposición.

Es importante destacar del cuadro del análisis de la varianza presentado en la Tabla 9 que el modelo, estadísticamente significativo, tiene en cuenta el efecto de los factores, concentración de Cr(VI) utilizados para riego y los días de exposición, como la interacción entre ellos.

De los distintas exposiciones se destaca el aumento en esta actividad, al regar las plantas con $100 \mu\text{g L}^{-1}$ durante 15 días y decae significativamente al regarla con $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI). Por otra parte las plantas que fueron expuestas durante 21 días presentaron un aumento significativo en CA al regarlas con $25 \mu\text{g L}^{-1}$ y al

exponerlas a mayores concentraciones decae este valor, aún más que en las plantas control.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
FRAP	22	0,89	0,835	5,9

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	44,553	7	6,365	16	<0,0001
[Cr(VI)] riego	25,723	3	8,574	22	<0,0001
Día	7,968	1	7,968	20	0,0005
[Cr(VI)] riego*Día	4,602	3	1,534	3,9	0,0322
Error	5,5	14	0,393		
Total	50,052	21			

Test:DGC

[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Medias	n	E.E.	
250	9,33	5	0,286	A
100	9,396	5	0,286	A
0	11,303	6	0,256	B
25	11,833	6	0,271	B

Test:DGC

Día	Medias	n	E.E.	
21	9,846	10	0,202	A
15	11,085	12	0,186	B

Test:DGC

[Cr(VI)] riego ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Día	Medias	n	E.E.	
100	21	7,976	3	0,4	A
250	21	8,913	2	0,4	B
250	15	9,746	3	0,4	B
100	15	10,817	2	0,4	C
0	21	11,136	3	0,4	C
25	21	11,359	2	0,4	C
0	15	11,469	3	0,4	C
25	15	12,308	4	0,3	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 9: Análisis de la varianza para CA determinada mediante FRAP en plantas de rúcula *Eruca sativa*.

La Figura 17 muestra la capacidad antioxidante (CA) en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a distintas concentraciones de Cr(VI). Esta capacidad fue determinada mediante el método FRAP y expresada como mg equivalentes de trolox (ET) por cada gramo de peso seco de la planta, debido a que éste es el compuesto que se utiliza como agente antioxidante en la determinación. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días.

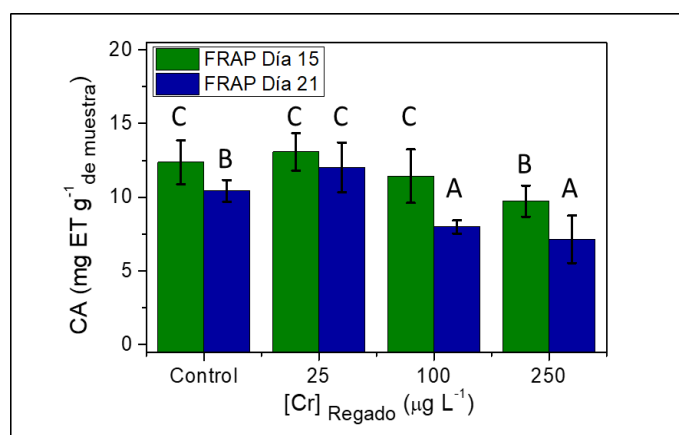


Figura 17: Capacidad antioxidante (CA) en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a distintas concentraciones de Cr(VI). CA fue determinada mediante el método FRAP y determinada como mg equivalentes de trolox (ET) por gramo de peso seco de planta. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Se muestra el promedio de los valores determinados y su intervalo de confianza. Las barras con letra común no tienen diferencia significativa ($p > 0,05$).

Como se describió anteriormente, esta técnica in vitro, permite evaluar el poder reductor de un antioxidante por medio de su capacidad para donar electrones y reducir el ion férrico a ferroso.

Del gráfico de la Figura 17 puede destacarse la disminución de CA cuando las plantas de rúcula fueron regadas durante 21 días con 100 y 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI)

al compararlas con el resto de los tratamientos. También hay un descenso en el poder reductor al exponerlas durante 15 días cuando la rúcula fue regada con 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI).

El ensayo de DPPH presenta tendencias similares al de FRAP, los resultados se muestran en la Figura 18. Los datos fueron analizados mediante ANOVA, obteniendo un modelo estadísticamente significativo, el cual incluye las interacciones de los factores días de exposición y [Cr(VI)] riego.

En la Figura 18, las letras diferentes representan que los valores de las medias presentan diferencias estadísticamente significativas.

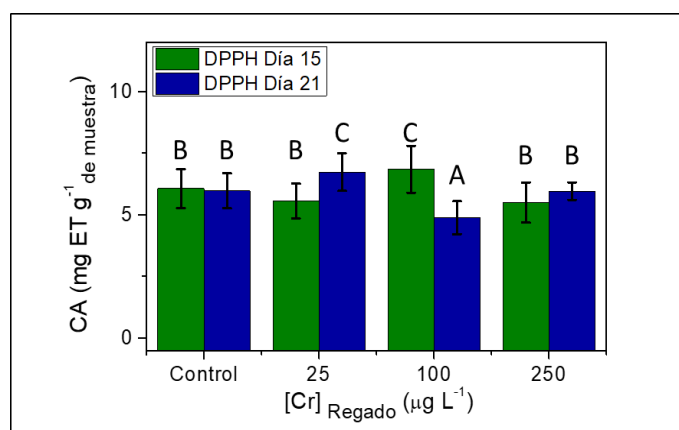


Figura 18: Capacidad antioxidante (CA) en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a distintas concentraciones de Cr(VI). La CA fue determinada mediante el método DPPH y determinada como mg equivalentes de trolox (ET) por cada gramo de peso seco de la planta. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Se muestra el promedio de los valores determinados y su intervalo de confianza. Las barras con letra común no tienen diferencia significativa ($p > 0,05$).

Es importante destacar que las plantas presentan una mayor actividad antioxidante al regarlas con 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI) durante 21 días y con 100 $\mu\text{g L}^{-1}$

de Cr(VI) por 15 días. A concentraciones mayores muestran un decaimiento en esta actividad.

Otro ensayo que determina la actividad de los polifenoles que tienen capacidad de captar radicales libres es el de ABTS, al igual que el de DPPH determina la CA, aunque mediante otro mecanismo de reacción.

Los resultados obtenidos en el ensayo de ABTS se muestran en la Figura 19, en la cual se representan en verde los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Las letras diferentes representan valores de medias con diferencias estadísticamente significativas, estas se obtuvieron al realizar el análisis de la varianza.

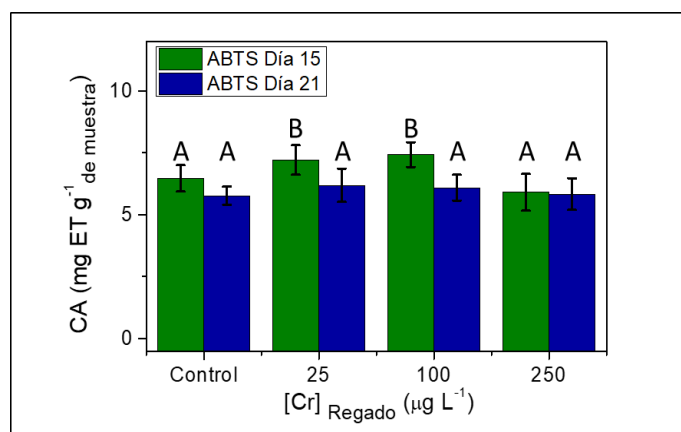


Figura 19: Capacidad antioxidante (CA) en muestras de rúcula *Eruca sativa* expuestas a distintas concentraciones de Cr(VI). La CA fue determinada mediante el método ABTS y determinada como mg equivalentes de trolox (ET) por cada gramo de peso seco de la planta. En verde se representan los valores obtenidos para las plantas regadas por 15 días y en azul durante 21 días. Se muestra el promedio de los valores determinados y su intervalo de confianza. Las barras con letra común no tienen diferencia significativa ($p > 0,05$).

Se logró un modelo significativo mediante el ANOVA, el cual incluye los efectos de los factores días de exposición y concentración de Cr(VI).

A partir del gráfico de la Figura 19 puede notarse que las plantas expuestas durante 15 días tienen una mayor CA al regarlas con 25 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI), luego decrece al exponerlas a la mayor concentración. Las plantas expuestas por 21 días no presentan diferencia significativa entre las expuestas a las distintas concentraciones de Cr(VI) respecto a las plantas control.

Los decaimientos tanto en PT como en CA se observan cuando las plantas son expuestas a las mayores concentraciones utilizadas, esto coincide con el deterioro físico detectado en las mismas, como se mostró con anterioridad en las fotografías (Figura 7).

De manera general puede explicarse el aumento de CA como un sistema de defensa de la planta respecto a la bioacumulación del metal en cuestión. En estos casos, las plantas reaccionan aumentando la concentración de PT, aumentando también la actividad antioxidante de las mismas. Por otra parte, la disminución de CA indica un decaimiento en el sistema de defensa natural de las plantas frente al estrés oxidativo que genera la exposición a Cr [33].

En la Figura 20 se muestra el análisis de correlación entre la concentración de PT y la capacidad antioxidante (CA). Estos valores se expresan en mg EAG por gramo de peso seco de planta para PT y en mg equivalentes de trolox (ET) por gramo de peso seco de planta para CA.

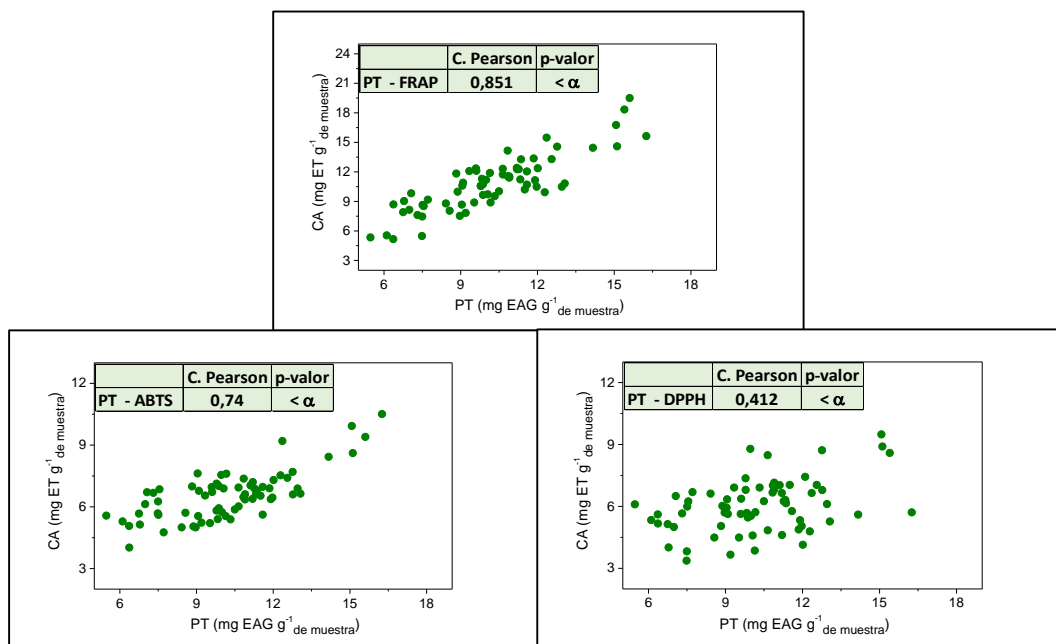


Figura 20: Estudio de la correlación de Pearson entre PT y la capacidad antioxidante determinada mediante tres técnicas: FRAP, ABTS y DPPH.

A partir de los gráficos de la Figura 20 se puede ver la existencia de una asociación lineal entre PT y las distintas determinaciones de CA. Al realizar el análisis estadístico se determinó que existe una correlación lineal estadísticamente significativa entre las variables ya que el coeficiente de correlación de Pearson presenta un p-valores menor a 0,05 para los tres ensayos. Los coeficientes determinados en estos estudios presentan signo positivo, dando idea de que aumenta CA al aumentar PT. Se ha descrito en bibliografía la existencia de una correlación entre el análisis de PT y los diferentes métodos de determinación de CA, esta correlación sugiere la existencia de un vínculo causal entre los niveles de PT y CA determinados [16,36].

Conclusiones sobre el estudio del efecto del Cr^{6+} en plantas de Rúcula de la especie *Eruca sativa*

Estos estudios permitieron evaluar, en una primera instancia, la capacidad del suelo de acumular Cr y determinar la fracción biodisponible de este metal, cumpliendo así con el primer objetivo planteado para este capítulo. Se determinaron concentraciones de Cr con diferencia significativa respecto a los suelos controles para las macetas expuestas a Cr(VI). Los máximos valores obtenidos fueron para los suelos regados durante 15 y 21 días con $250 \mu\text{g L}^{-1}$ y las concentraciones medias obtenidas fueron $0,68$ y $0,76 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente.

Mediante la evaluación de la capacidad de acumular Cr en plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa* frente a exposiciones crónicas (15 y 21 días) se cumplió con el segundo objetivo ya que no solo se cuantificó la cantidad del metal acumulado, sino que además se obtuvieron diferencias significativas de la concentración de Cr acumulado respecto a los controles. El máximo valor obtenido fue de $3,53 \mu\text{g g}^{-1}$ para las plantas expuestas a $250 \mu\text{g L}^{-1}$ durante 21 días.

A partir del análisis del contenido de polifenoles totales, y mediante la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos de la familia de flavonoles fue posible cumplir con los últimos dos objetivos.

En el estudio del contenido de polifenoles totales se encontró un máximo de concentración ($12,2 \text{ mgEAG g}^{-1}$) de los mismos, entendido como una máxima respuesta de defensa frente al estrés generado por la exposición a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI) durante 15 días [20]. Para las plantas expuestas durante 21 días a 100 y 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ se determinó un decaimiento en esta respuesta ($7,2$ y $7,1 \text{ mgEAG g}^{-1}$,

respectivamente) interpretando que las plantas ya no pueden defenderse frente al estrés producido [20]. Se pudieron determinar 16 compuestos fenólicos de la familia de flavonoles: 7 derivados del kaempferol, 6 derivados de la quercetina y 3 derivados de la isorhamnetina.

Del total de polifenoles cuantificados se puede establecer que algunos compuestos (isorhamnetina, isorhamntin diglucósido, isorhmantin glucósido, quercetin diglucosido, kaempferol diglucosido y quercetina) no actúan como mecanismo de desintoxicación frente al Cr eliminando especies de ROS [43] y mientras que otros (kaempferol, quercetin glucósido, quercetin triglucósido kaempferol glucosido, quecetin glucósido sinapoyl glucósido, quercetin diglucósido sinapoyl glucósido y kaempferol triglucósido) si presentan cambios frente a la exposición a Cr, se interpreta que el aumento de este tipo de metabolitos deriva del sistema de defensa de las plantas frente al estrés oxidativo procedente al ambiente que están expuestas [20,22,43].

Se utilizaron tres técnicas diferentes para determinar la capacidad antioxidante, FRAP que evalúa la capacidad redox y las de DPPH y ABTS que valoran la capacidad de captar radicales libres. La tendencia general encontrada es un decaimiento en CA al exponerlas durante 21 días a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y al regarlas con $250 \mu\text{g L}^{-1}$ durante 15 o 21 días.

La correlación entre la capacidad antioxidantes y el contenido de polifenoles totales que se logró determinar sugiere un vínculo causal entre PT y CA determinadas [16,36].

Con el fin de responder la pregunta disparadora: ¿Cómo afecta al desarrollo y al sistema de defensa de plantas comestibles la exposición crónica a Cr(VI)? A

partir de los estudios realizados, se observa un marcado desmejoramiento físico en las plantas expuestas a Cr(VI) durante 21 días para las concentraciones de regado más altas (Figura 7). El estudio integral de la concentración de polifenoles muestra el aumento de algunos metabolitos, lo que se podría interpretar como una respuesta de defensa frente al estrés oxidativo.

Bibliografía

- [1] E.I. Hamilton, State of the art of trace element determinations in plant matrices: determination of the chemical elements in plant matrices, an overview, *Sci. Total Environ.* 176 (1995) 3–14.
- [2] A. Kabata-Pendias, Soil-plant transfer of trace elements an environmental issue, *Geoderma*, 122, 143-149. 122 (2004) 143–149.
- [3] L.M. Condrón, K.C. Cameron, H.J. Di, T.J. Clough, E.A. Forbes, R.G. McLaren, R.G. Silva, A comparison of soil and environmental quality under organic and conventional farming systems in New Zealand, *New Zeal. Agric. Res.* 43 (2000) 443–466.
- [4] M. Andrades, P. Carral, E. Martínez Villar, A. Álvarez, J.I. Alonso-Martirena, Contenido en metales pesados y calidad de suelos en cultivos frutales de La Rioja, *Edafología*. 7 (2000) 313–318.
- [5] M. Arshad, S. Martin, Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems, *Agric. Ecosyst. Environ.* 88 (2002) 153–160.
- [6] J.P. Navarro-Aviñó, I. Aguilar Alonso, J.R. López-Moya, Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas, *Ecosistemas*. 16 (2007) 10–25.
- [7] V. Angelova, R. Ivanova, V. Delibaltova, K. Ivanov, Bioaccumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp), *Ind. Crops Prod.* 19 (2004) 197–205.
- [8] H. Ma, M. Hung, P. Chen, A systemic health risk assessment for the

- chromium cycle in Taiwan, *Environ. Int.* 33 (2007) 206–218.
- [9] M. Shahid, S. Shamshad, M. Rafiq, S. Khalid, I. Bibi, N.K. Niazi, C. Dumat, M.I. Rashid, Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review, *Chemosphere*. 178 (2017) 513–533.
- [10] C. Santos, E. Rodriguez, Review on Some Emerging Endpoints of Chromium (VI) and Lead Phytotoxicity, *Intech Open Access Publ.* (2012).
- [11] M. Rafati, N. Khorasani, F. Moattar, A. Shirvany, F. Moraghebi, S. Hosseinzadeh, Phytoremediation potential of *populus alba* and *morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil, *Int. J. Environ. Res.* 5 (2011) 961–970.
- [12] M. Poniedziałek, A. Sękara, Nickel and manganese accumulation and distribution in organs of nine crops, *Folia Hortic.* 17 (2005) 11–22.
- [13] A. Schützendübel, P. Schwanz, T. Teichmann, K. Gross, R. Langenfeld-Heyser, D.L. Godbold, A. Polle, Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots, *Plant Physiol.* 127 (2001) 887–98.
- [14] H. Ali, E. Khan, M.A. Sajad, Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications, *Chemosphere*. 91 (2013) 869–881.
- [15] H.M. Tauqeer, S. Ali, M. Rizwan, Q. Ali, R. Saeed, U. Iftikhar, R. Ahmad, M. Farid, G.H. Abbasi, Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: Growth and physiological response, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*

- 126 (2016) 138–146.
- [16] R. Rodrigo, M. Libuy, *Modulation of Plant Endogenous Antioxidant Systems by Polyphenols*, Elsevier, 2014.
- [17] M. Lingua, *De la uva al vino: Estudio de las propiedades antioxidantes y dilucidación de los mecanismos de acción de sus compuestos polifenólicos*, (2016) Tesis Doctoral UNC.
- [18] I. Stolfa, T. Pfeiffer, D. Spoljaric, T. Teklic, Z. Loncaric, *Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Plants: Response of the Antioxidative System*, Osijek, Croatia, 2015.
- [19] E. García, I. Fernández, A. Fuentes, *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu*, Univ. Politécnica Val. 1 (2015) 2–8.
- [20] C. Fallovo, M. Schreiner, D. Schwarz, G. Colla, A. Krumbein, *Phytochemical changes induced by different nitrogen supply forms and radiation levels in two leafy brassica species*, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 4198–4207.
- [21] M. Villatoro-Pulido, R. Font, S. Saha, S. Obregón-Cano, J. Anter, A. Muñoz-Serrano, A. De Haro-Bailón, A. Alonso-Moraga, M. Del Río- Celestino, *In vivo biological activity of rocket extracts (Eruca vesicaria subsp. sativa (Miller) Thell) and sulforaphane*, Food Chem. Toxicol. 50 (2012) 1384–1392.
- [22] J. Jin, O.A. Koroleva, T. Gibson, J. Swanston, J. Maganj, Y.A.N. Zhang, I.R. Rowland, C. Wagstaff, *Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of rocket (Eruca sativa and Diplotaxis tenuifolia) leafy salad following cultivation in different environments*, J. Agric. Food

- Chem. 57 (2009) 5227–5234.
- [23] B. Weckerle, K. Michel, B. Balázs, P. Schreier, G. Tóth, Quercetin 3,3',4'-tri-O-b-D-glucopyranosides from leaves of *Eruca sativa* (Mill.), *Phytochemistry*. 57 (2001) 547–551.
- [24] M. Sarwar Alam, G. Kaur, Z. Jabbar, K. Javed, M. Athar, *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 910–920.
- [25] M. Selma, A. Martinez-Sanches, A. Allende, M. Ros, M. Hernandez, M. Gil, Impact of organic soil amendments on phytochemicals and microbial quality of rocket leaves (*Eruca sativa*), *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8331–8337.
- [26] R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS*, 2004.
- [27] A. Technologies, *Agilent 7500 Series ICP-MS Hardware Manual*, USA, 2008.
- [28] D. Skoog, D. West, F. James Holler, *Química Analítica*, Quinta Edi, 1995.
- [29] D. Skoog, J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*, Fourth edi, 1992.
- [30] M.S. Lingua, M.P. Fabani, D.A. Wunderlin, M. V. Baroni, In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile, *J. Funct. Foods*. 20 (2016) 332–345. doi:10.1016/j.jff.2015.10.034.
- [31] M.S. Lingua, M.P. Fabani, D.A. Wunderlin, M. V. Baroni, From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity, *Food Chem.* 208 (2016) 228–238. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.009.

- [32] J.A. Di Rienzo, F. Casanoves, L.A. Gonzales, E.M. Tablada, M. del P. Díaz, C.W. Robledo, M.G. Balzarini, Estadística para las Ciencias Agropecuarias, Quinta Ed, Córdoba, Argentina, 2003.
- [33] V. Scoccianti, A.E. Bucchini, M. Iacobucci, K.B. Ruiz, S. Biondi, Oxidative stress and antioxidant responses to increasing concentrations of trivalent chromium in the Andean crop species *Chenopodium quinoa* Willd, Ecotoxicol. Environ. Saf. 133 (2016) 25–35.
- [34] H. Amin, B.A. Arain, F. Amin, M.A. Surhio, Phytotoxicity of Chromium on Germination , Growth and Biochemical Attributes of *Hibiscus esculentus* L., Am. J. Plant Sci. 4 (2013) 2431–2439.
- [35] M.A. da C. Gomes, R.A. Hauser-Davis, M.S. Suzuki, A.P. Vitória, Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations, Ecotoxicol. Environ. Saf. 140 (2017) 55–64.
- [36] C. Cervantes, J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J.C. Torres-Guzmán, R. Moreno-Sánchez, Interactions of chromium with microorganisms and plants, FEMS Microbiol. Rev. 25 (2001) 335–347.
- [37] A. Zayed, C.M. Lytle, J.H. Qian, N. Terry, Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops, Planta. 206 (1998) 293–299.
- [38] Canadian Environmental Quality Guidelines, SUMMARY TABLE - Summary of Existing Canadian Environmental Quality Guidelines, 2003.
- [39] CONAMA, Qualidade de Água. Resolução CONAMA nº 357, Brasil, 2005.

- [40] O. Mancilla-Villa, H. Ortega-Escobar, C. Ramirez-Ayala, E. Uscanga-Mortera, R. Ramos-Bello, A. Reyes-Ortigoza, METALES PESADOS TOTALES Y ARSÉNICO EN EL AGUA PARA RIEGO DE PUEBLA Y VERACRUZ, MÉXICO, *Rev. Int. Contam. Ambient.* 28 (2012) 39–48.
- [41] Ministerio de ambiente y desarrollo social, Decreto 831/93: Niveles guía de calidad de agua para irrigación, Argentina, 1993.
- [42] K. Ablajan, Z. Abliz, X.-Y. Shang, J.-M. He, R.-P. Zhang, J.-G. Shi, Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionisation tandem mass spectrometry., *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 352–360.
- [43] S. Volland, C. Lütz, B. Michalke, U. Lütz-Meindl, Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*, *Aquat. Toxicol.* 109 (2012) 59–69.

Conclusiones generales y Perspectivas futuras

Cromo: un metal pesado que se puede especiar,
entender y del cual se pueden conocer sus
efectos en el ambiente



Conclusiones generales

En este trabajo se logró desarrollar una técnica analítica con fundamentos electroquímicos que permitió cuantificar y especiar Cr, identificando las dos especies más abundantes en la naturaleza: Cr(III) y Cr(VI).

Para minimizar el número de experimentos se utilizaron diseños de superficies de respuestas en el proceso de optimización de la técnica electroanalítica desarrollada, particularmente DCC para el análisis de las variables químicas y DBB para las instrumentales. Mediante estos diseños se pudieron estudiar los efectos individuales e interactivos de los distintos factores. Se obtuvieron los modelos polinomiales de segundo orden para predecir la corriente de reducción de Cr(III). A partir de esos estudios se logró conocer el comportamiento del sistema y se encontraron de manera efectiva las condiciones óptimas de trabajo, consiguiendo una mayor respuesta frente a pequeños cambios de concentración. Con la técnica desarrollada se logró obtener un límite de detección y cuantificación en el orden de unos pocos $nmol L^{-1}$ (LD = 3,3 y LQ = 8,5).

Mediante simulaciones matemáticas fue posible dilucidar el mecanismo del proceso electroquímico que tiene lugar con la técnica electroanalítica desarrollada. Se lograron excelentes ajustes entre las curvas experimentales y los perfiles teóricos al considerar que el mecanismo de reacción catalítico del tipo 2 con adsorción de las especies en la superficie del electrodo. Para entender lo que ocurre en la cercanía del electrodo se consideró que el complejo $Cr(III) - H_2O - DTPA$ reacciona con el ion NO_3^- para producir la especie electroactiva $Cr(III) - NO_3^- - DTPA$ y mediante cálculos se determinó que la señal electroquímica involucra 2 electrones. Por este motivo es que en el trabajo se propuso que, como producto del paso electroquímico,

se libera NO_2^- a la solución. Entendiéndose que el complejo de $\text{Cr(III)} - \text{DTPA}$ funcionaría como catalizador para la reducción de NO_3^- a NO_2^- .

Se evaluó la capacidad del suelo de acumular Cr(VI) y se determinó la fracción biodisponible de este metal, obteniéndose concentraciones de Cr , en los suelos expuestos a Cr(VI) , con diferencia significativa respecto a los suelos controles. Por otra parte, en las plantas de rúcula de la especie *Eruca sativa* se logró evaluar la capacidad de acumular Cr(VI) frente a exposiciones crónicas (15 y 21 días) obteniéndose diferencias significativas entre las plantas expuestas con los controles.

Se llevó a cabo el estudio de polifenoles totales con el fin de estimar el sistema de defensa de las plantas frente al agregado de Cr en el agua de riego. Se encontró una respuesta de defensa máxima para la exposición durante 15 días a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI) . El decaimiento posterior se debería a la incapacidad de las plantas a defenderse frente al estrés producido por concentraciones mayores o tiempo de exposición más largo.

Se determinaron 16 compuestos fenólicos, todos de la familia de flavonoles, 7 fueron derivados del kaempferol, 6 de la quercetina y 3 de la isorhamnetina. Del total de polifenoles cuantificados se estableció que algunos compuestos no actúan como mecanismo de desintoxicación frente al Cr eliminando especies de ROS, mientras que otros aumentan la concentración, entendiendo que estos metabolitos derivan del sistema de defensa de las plantas frente al estrés oxidativo procedente al ambiente al que están expuestas.

La tendencia general encontrada para la capacidad antioxidante de las plantas fue un decaimiento de esta al exponerlas durante 21 días a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y al regarlas con $250 \mu\text{g L}^{-1}$ durante 15 o 21 días. A partir del análisis de la correlación entre la

capacidad antioxidantes y el contenido de polifenoles totales se pudo establecer la existencia de un vínculo causal entre polifenoles totales y la capacidad antioxidante, indicando que la existencia de polifenoles serviría de defensa frente al estrés oxidativo.

Perspectivas futuras

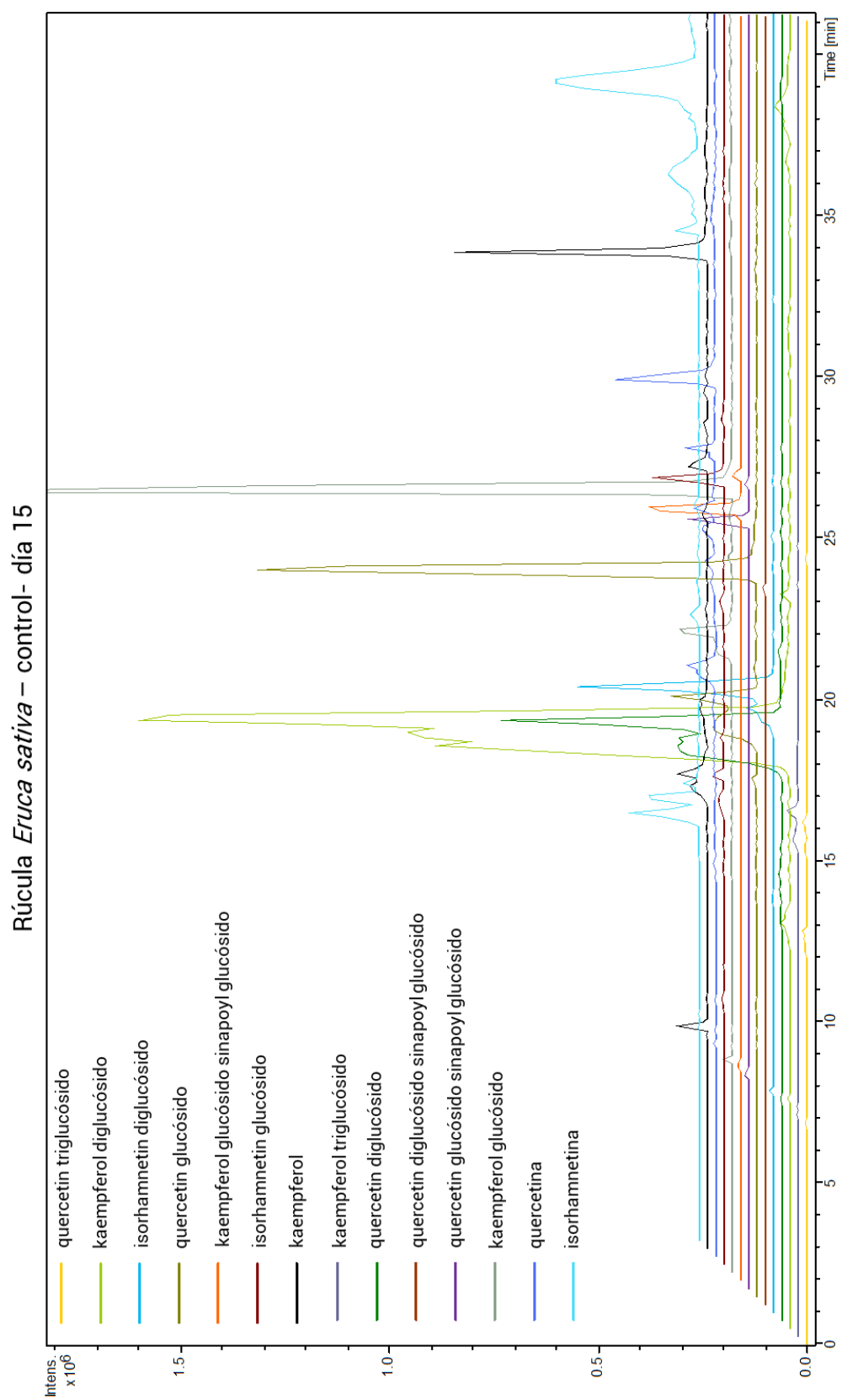
Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se logró cumplir con muchos de los objetivos propuestos, sin embargo, algunas de las inquietudes planteadas no llegaron a concretarse, ya sea por falta de tiempo o por falta del instrumental adecuado.

En particular, no se llegó a especiar el Cr en las plantas de rúcula, lo cual podría haber ofrecido información adicional respecto de los cambios de estado de oxidación del Cr al ser incorporado por la planta.

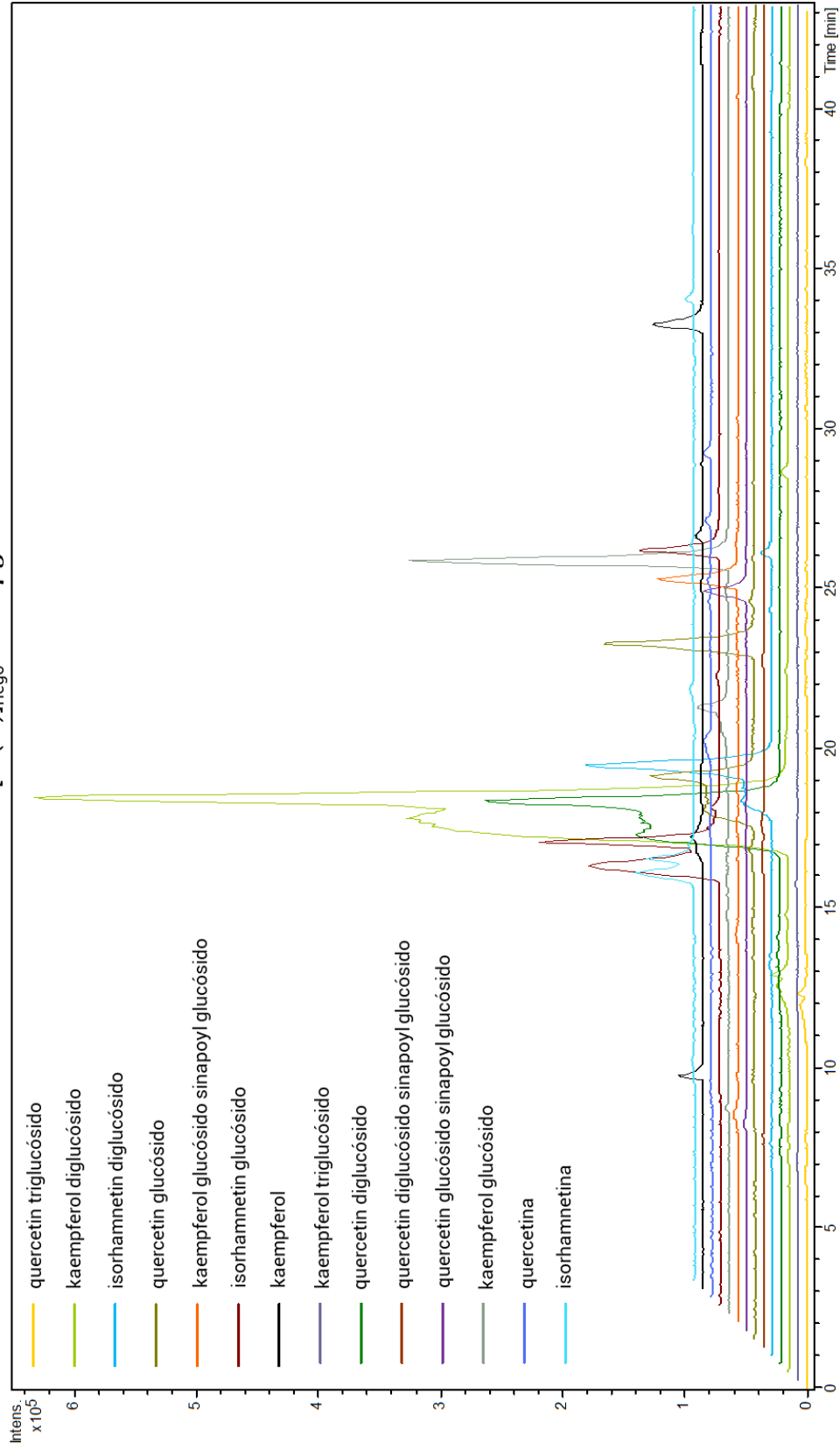
Por otra parte, la metodología desarrollada podría ser empleada para la especiación de Cr en otras matrices de interés ambiental.

ANEXO

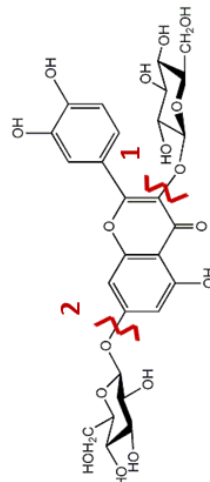




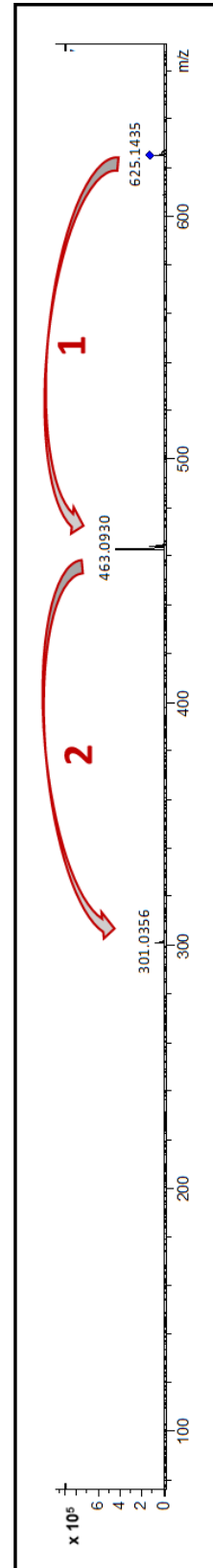
Rúcula *Eruca sativa* – [Cr(VI)]_{iriego} = 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ - día 15



Ejemplo de identificación de los compuestos a través de los patrones de fragmentación



Quercetin diglucósido



Procedimiento ABTS (según Re et al. 1999)

10mL de ABTS 7mM en H₂O MilliQ y agregar K₂S₂O₈ para generar el radical
(0,0388g ABTS + 0,0067g K₂S₂O₈ a Vol. final=10mL con H₂O MilliQ.)



Proteger de la luz y dejar estabilizar por 12 h (ON) a T ambiente



Preparar Rvo. de Trabajo: dil aprox 1/80 del ABTS⁺ con MetOH hasta Abs = 0,70±0,02 a 734 nm



Preparar el Std. de TROLOX 1mM en MetOH y hacer curva de calibración



Mezclar 3mL ABTS⁺ con 100 µL de mtra. o x µL de Std.

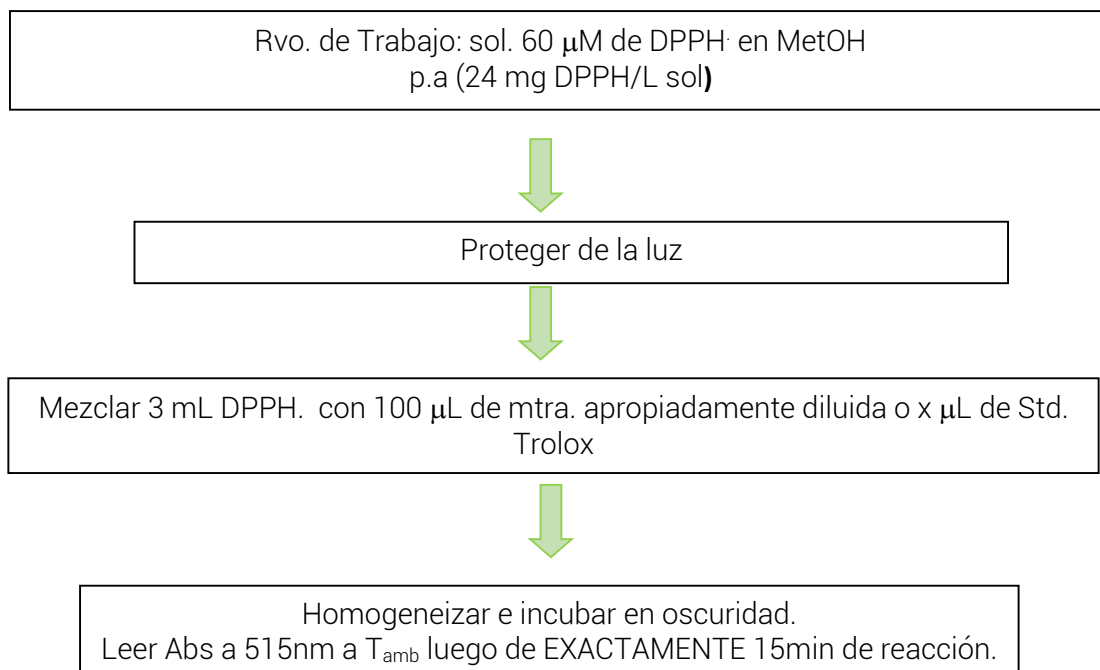


Homogeneizar e incubar en oscuridad.
Leer Abs a 734nm a T_{amb} luego de EXACTAMENTE 4 min de reacción.

<i>Curva calibración de TROLOX para TEAC</i>				
Rango de Concentración de la Curva:	0-0,032mM TROLOX			
Solución Madre de TROLOX (PM = 250,29 g/mol):	1mM (0,00625725g TROLOX en 25mL MetOH)			
Volumen Final:	3100 µL			
	[Std.]mM	Vol. ABTS ⁺ (mL)	Vol. MetOH (µL)	Vol. Slon. Madre de TROLOX (µL)
Blanco	0	3	100	-
Std. 1	0,001598146	3	95	5
Std. 2	0,003196292	3	90	10
Std. 3	0,006392585	3	80	20
Std. 4	0,009588877	3	70	30
Std. 5	0,015981462	3	50	50
Std. 6	0,0207759	3	35	65

Solubilidad del TROLOX: en EtOH = 160 mg/mL, en MetOH = 0,5 mg/mL

Procedimiento DPPH (según Brand-Williams et al. 1995 y Villaño et al 2006)



<i>Curva calibración de TROLOX para DPPH</i>				
Rango de Concentración de la Curva:	0-0,032mM TROLOX			
Solución Madre de TROLOX (PM=250,29g/mol):	1mM (0,00625725g TROLOX en 25mL MetOH)			
Volumen Final:	3100 μL			
	[Std.]mM	Vol. DPPH (mL)	Vol. MetOH (μL)	Vol. Slon. Madre de TROLOX (μL)
Blanco	0	3	100	-
Std. 1	0,001598146	3	95	5
Std. 2	0,003196292	3	90	10
Std. 3	0,006392585	3	80	20
Std. 4	0,009588877	3	70	30
Std. 5	0,015981462	3	50	50
Std. 6	0,0207759	3	35	65

Solubilidad del TROLOX: en EtOH=160mg/mL, en MetOH=0,5mg/mL

Procedimiento FRAP (según Benzie and Strain 1996)

Preparar Rvo. de Trabajo (Buffer Ac⁻/HAc pH=3,6 / TPTZ 10mM en HCL 40 mM/
FeCl₃.6H₂O 20 mM



Proteger de la luz



Mezclar 3 mL de Rvo. de Trabajo con 100 μ L de mtra. o x μ L de Std.



Homogeneizar e incubar en oscuridad.
Leer Abs a 593 nm a T_{amb} luego de EXACTAMENTE 6 min de
reacción.

Curva calibración de TROLOX para FRAP				
Rango de Concentración de la Curva:	0-0,032mM TROLOX			
Solución Madre de TROLOX (PM=250,29g/mol):	1mM (0,00625725g TROLOX en 25mL MetOH)			
Volumen Final:	3100 μ L			
	[Std.]mM	Vol. ABTS.+ (mL)	Vol. MetOH (μ L)	Vol. Slon. Madre de TROLOX (μ L)
Blanco	0	3	100	-
Std. 1	0,001598146	3	95	5
Std. 2	0,003196292	3	90	10
Std. 3	0,006392585	3	80	20
Std. 4	0,009588877	3	70	30
Std. 5	0,015981462	3	50	50
Std. 6	0,0207759	3	35	65

Solubilidad del TROLOX: en EtOH=160 mg/mL, en MetOH=0,5 mg/mL

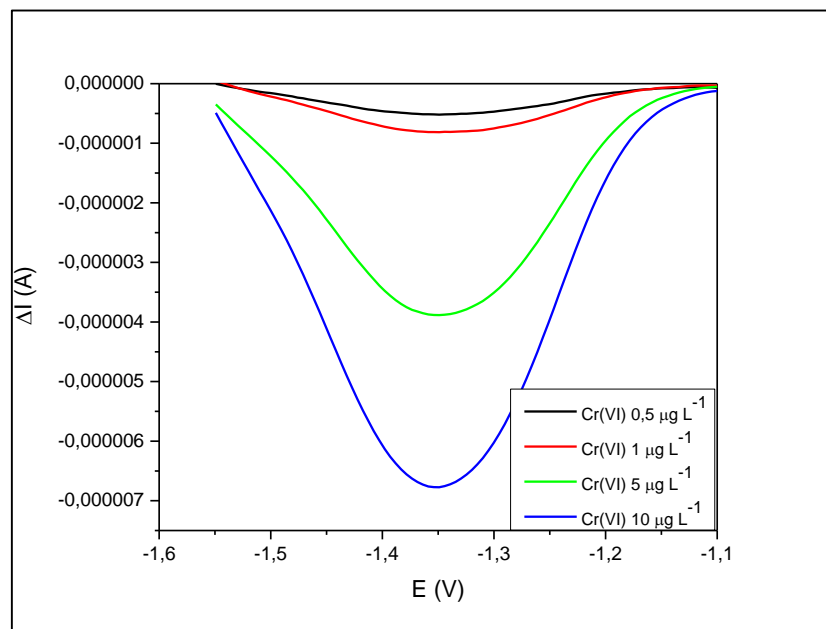
Para preparar 60 mL de Rvo. de Trabajo:

*Buffer Acetato pH=3,6: 3,1 g ActNa.3H₂O + 16 mL HAc glacial----enrasar a 1 L con H₂O MilliQ, medir pH y ajustar, si es necesario, a 3,6 con HCl.

*TPTZ 10 mM en HCl 40 mM (C₁₈H₁₂N₁₆; PM=312,33 g/mol; Solubilidad=0,1 g/mL de MetOH): HCl 40 mM = 200 μ L de HCl puro (10 M) y enrasar a 50 mL con H₂O MilliQ; TPTZ 10 mM = 0,0156 g TPTZ y llevar a Vol. final = 5 mL con HCl 40 mM.

* FeCl₃.6H₂O 20 mM (PM=270,30 g/mol): 0,0270 g FeCl₃.6H₂O y llevar a Vol. final = 5 mL con H₂O MilliQ.

Ejemplo de voltagramas obtenido mediante SWV para distintas concentraciones de Cr(VI)



Procedimiento SWV

Buffer (Ac. Acético + acetato) C.A. = 0,5 mol L⁻¹ Vol = 2 mL
Ajustar el pH con KOH o HCl



DTPA 0,01 mol L⁻¹ Vol = 10 mL
Para disolver llevar a pH básico con 5 gotas de NH₄OH



KNO₃ 2 mol L⁻¹ Vol = 5 mL



H₂O Vol = 5 mL



Medir: $E_{ac} = -1,1 V$, $t_{ac} = 120 s$, $E_{sw} = -50 mV$, $dE = -5 mV$ y $f = 500 Hz$.
 E_{sw} y dE deben llevar signos negativos porque el barrido es catódico.

